



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

FACTORES INTERVENIENTES NA EFICIÊNCIA DE PROGRAMAS DE
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES: A ÉGUA DADORA IDOSA

ADRIANA CATARINA VIEIRA ALBERTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor Rui Vasconcelos Horta Caldeira

Vogais

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

Doutor Luís Lopes da Costa

ORIENTADOR

Doutor Luís Lopes da Costa

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

FACTORES INTERVENIENTES NA EFICIÊNCIA DE PROGRAMAS DE
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES: A ÉGUA DADORA IDOSA

ADRIANA CATARINA VIEIRA ALBERTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor Rui Vasconcelos Horta Caldeira

Vogais

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

Doutor Luís Lopes da Costa

ORIENTADOR

Doutor Luís Lopes da Costa

2010

LISBOA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe por todos os esforços feitos ao longo destes anos e por todo o apoio e carinho ao longo da minha vida, todos os ensinamentos, devendo a ela tudo o que sou. Embora por vezes a nossa relação seja conflituosa, nutro todo o amor e respeito por ti. Obrigada por tudo.

Dedico ainda este trabalho a todos os meus amigos e a todas as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui, me fizeram sorrir nos momentos difíceis e nunca desistir. Obrigada.

*Os dias prósperos não vêm ao acaso;
são granjeados, como as searas, com muita fadiga
e com muitos intervalos de desalento.
(Camilo Castelo Branco)*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luís Lopes da Costa por toda a ajuda na construção desta dissertação, transmissão de conhecimentos ao longo do estágio e pela paciência e horas de dedicação.

Ao Professor Doutor Luís Losinno por me ter recebido em Rio Cúarto, por todos os conhecimentos transmitidos e pela cedência dos dados utilizados na realização desta dissertação.

Ao Dr. José Prazeres, à Dr.^a Maria Antónia Nabais e à Dr.^a Susana Rodrigues por me terem recebido em Santo Estêvão, pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de participação em diversos eventos ao longo do estágio.

À Cláudia Ramalho, ao Hélio Ferreira, à Helena Ribeiro, à Filipa Joglar, à Ana Luísa Costa e à Ana Catarina Torres, por toda a ajuda e amizade ao longo do estágio.

Ao Dr. Nuno Bernardes pela ajuda ao longo do curso e pelos momentos de desabafo e decisão.

Aos meus colegas de curso, hoje grandes amigos, pelos momentos de diversão, mas também pela ajuda na superação dos momentos menos bons.

Ao meu namorado, José Gandarez, por toda a ajuda ao longo destes 5 anos, pela paciência, amor e carinho em todos os momentos.

À minha família e amigos pelo que sou. Obrigada por poder contar sempre convosco, mesmo longe, estão sempre no meu coração.

TÍTULO: Factores intervenientes na eficiência de programas de transferência de embriões: a égua dadora idosa

RESUMO:

As éguas dadoras são o coração de qualquer programa de transferência de embriões. As éguas idosas são uma constante neste tipo de programas, uma vez que são estas que já deram provas do seu valor e que já têm descendentes que demonstram a sua qualidade. Os objectivos deste trabalho foram avaliar os parâmetros reprodutivos que afectam a eficiência de um programa de transferência de embriões e compreender a importância da égua dadora idosa neste tipo de programas. Foram analisados os dados de um centro de produção de embriões de grande escala, localizado na Argentina, ao longo de 3 épocas reprodutivas. Os parâmetros reprodutivos analisados foram: taxa de ovulação, taxa de embriões recolhidos, eficiência da recolha, taxa de gestação e taxa de mortalidade embrionária. As variáveis contínuas foram analisadas por GLM / MANOVA e as variáveis categóricas pelo teste de Qui-quadrado, tendo sido utilizado o limiar de $p < 0,05$ para estabelecer as diferenças significativas. A categoria égua idosa afectou significativa e negativamente a taxa de embriões recolhidos, a eficiência da recolha e a taxa de gestação. Em contrapartida, a taxa de ovulação e a taxa de mortalidade embrionária foram afectadas significativa e positivamente. Também a incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios, de endometrite pós inseminação artificial e de ovulações múltiplas foi significativamente maior na categoria égua idosa do que na categoria égua jovem. Conclui-se que a égua dadora idosa representa uma das variáveis mais importantes a ter em consideração na eficiência de um programa de transferência de embriões. Nesta categoria de éguas torna-se relevante a monitorização antes e após a inseminação artificial para identificação dos casos de reacção inflamatória endometrial e sua terapêutica, antes da recolha de embriões.

PALAVRAS-CHAVE: transferência de embriões; égua dadora; égua idosa; eficiência reprodutiva

TITLE: Factors affecting the efficiency of embryo transfer programs: the old donor mare

ABSTRACT:

The donor mare is the heart of any embryo transfer program. Old mares are a constant in this type of programs, since they have already proved their worth and already have descendants that demonstrate their quality. The purpose of this study was to evaluate the reproductive parameters affecting the efficiency of an embryo transfer program and understand the importance of the old donor mare in the efficiency of this type of programs. Data from an embryo production center in Argentina were analysed considering three reproductive seasons. The reproductive parameters analyzed were: ovulation rate, embryo recovery rate, recovery efficiency, pregnancy rate and embryonic mortality rate. The continuous variables were analyzed by GLM / MANOVA and the categorical variables by Chi-square tests, for a minimum significance level of 5% ($p < 0.05$). The category old of donor mares significantly and negatively affected the rates of embryo recovery, recovery efficiency and pregnancy. In contrast, the ovulation rate and the embryonic mortality rate were significantly and positively affected. Also, the incidence of hemorrhagic anovulatory follicles, endometritis post artificial insemination and multiple ovulation was significantly higher in the category old of donor mares than in the category young. It is concluded that the category old of donor mares represents one of the most important variables to take into account in the efficiency of an embryo transfer program. In this category of mares it is relevant to monitor the mare both before and after artificial insemination, attempting to identify and treat cases of endometrial inflammatory reaction, prior to embryo recovery.

KEY WORDS: embryo transfer; donor mare; old mare; reproductive efficiency

ÍNDICE

Índice de gráficos.....	xiii
Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas e símbolos	xv
I. Introdução.....	1
II. Relatório de estágio.....	2
1. Actividades realizadas.....	2
1.1. Argentina	2
1.2. Santo Estêvão	3
1.2.1. Cirurgia	4
1.2.2. Clínica.....	4
1.2.3. Ambulatório.....	4
1.3. FMV – Secção de Reprodução e Obstetrícia.....	5
III. Revisão bibliográfica	9
1. Transferência de embriões	9
1.1. Breve nota histórica	9
1.2. Indicações da técnica de transferência de embriões	9
1.3. Centros de produção de embriões.....	10
1.4. Programas de recolha e transferência de embriões	11
1.4.1. Maneio dadora – receptora(s).....	12
1.4.2. Recolha do embrião.....	12
1.4.3. Localização e avaliação do embrião	13
1.4.4. Transferência transcervical do embrião	14
1.5. Eficiência da transferência de embriões	15
1.6. Limitações da transferência de embriões na espécie equina.....	15
1.6.1. Superovulação.....	16
1.6.2. Criopreservação de embriões	16
2. A égua dadora idosa.....	17
2.1. Importância da égua dadora idosa em programas de transferência de embriões	17
2.2. Ciclos irregulares.....	18
2.3. Folículos hemorrágicos anovulatórios	18

2.4. Endometrite	19
2.5. Endometrose	20
2.6. Alterações endócrinas e metabólicas	21
2.7. Mortalidade embrionária e patologia oviductal	22
3. Aspectos a melhorar no manejo reprodutivo da égua dadora idosa	25
IV. Trabalho experimental	28
1. Materiais e métodos	28
1.1. Animais e manejo	28
1.2. Análise de dados	29
2. Resultados	30
2.1. Variáveis com influência na taxa de ovulação	31
2.1.1. Época reprodutiva	32
2.1.2. Égua dadora	32
2.1.3. Idade da égua dadora	32
2.1.4. Categoria da égua dadora	33
2.1.5. Garanhão	33
2.1.6. Nº ciclo éstrico	34
2.1.7. Diâmetro do folículo dominante	34
2.1.8. Tratamento indutor de ovulação	35
2.2. Variáveis com influência na taxa de embriões recolhidos	36
2.2.1. Égua dadora	36
2.2.2. Categoria da égua dadora	36
2.2.3. Garanhão	36
2.2.4. Nº do ciclo éstrico	37
2.2.5. Nº de inseminações / ciclo	37
2.2.6. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia	38
2.2.7. Endometrite pós inseminação artificial	39
2.3. Variáveis com influência na eficiência da recolha	39
2.3.1. Égua dadora	39
2.3.2. Categoria da égua dadora	40

2.3.3. Garanhão	40
2.3.4. Nº do ciclo éstrico	40
2.3.5. Tratamento indutor de ovulação	41
2.3.6. Nº de inseminações / ciclo	41
2.3.7. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia	42
2.3.8. Endometrite pós inseminação artificial	43
2.3.9. Nº de embriões recolhidos	44
2.4. Variáveis com influência na taxa de gestação	44
2.4.1. Época reprodutiva	45
2.4.2. Égua dadora	46
2.4.3. Categoria da égua dadora.....	46
2.4.4. Endometrite pós inseminação artificial	47
2.5.1. Época reprodutiva	47
2.5.2. Égua dadora	48
2.5.3. Categoria da égua dadora.....	48
2.5.4. Endometrite pós inseminação artificial	49
2.6. Outras variáveis com efeito significativo na eficiência de programas de transferência de embriões	49
2.6.1. Incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios.....	49
2.6.2. Incidência de endometrite pós inseminação artificial.....	50
2.6.3. Incidência de ovulações múltiplas	50
3. Discussão dos resultados	51
3.1. Égua dadora.....	51
3.2. Variáveis com influência na taxa de ovulação	51
3.2.1. Época reprodutiva	51
3.2.2. Idade e categoria da égua dadora.....	51
3.2.3. Garanhão.....	52
3.2.4. Nº do ciclo éstrico	52
3.2.5. Diâmetro do folículo dominante.....	53
3.2.6. Tratamento indutor de ovulação.....	53

3.3. Variáveis com influência na taxa de embriões recolhidos	54
3.3.1. Categoria da égua dadora.....	54
3.3.2. Garanhão	54
3.3.3. Nº do ciclo éstrico.....	54
3.3.4. Nº de inseminações / ciclo	54
3.3.5. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia	55
3.3.6. Endometrite pós inseminação artificial	55
3.4. Variáveis com influência na eficiência da recolha	56
3.4.1. Categoria da égua dadora.....	56
3.4.2. Garanhão	56
3.4.3. Nº ciclo éstrico	56
3.4.4. Tratamento indutor de ovulação	57
3.4.5. Nº de inseminações / ciclo	57
3.4.6. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia	58
3.4.7. Endometrite pós inseminação artificial	58
3.4.8. Nº de embriões recolhidos	58
3.5. Variáveis com influência na taxa de gestação	58
3.5.1. Época reprodutiva	58
3.5.2. Categoria da égua dadora.....	59
3.5.3. Endometrite pós inseminação artificial	60
3.6. Variáveis com influência na taxa de mortalidade embrionária.....	60
3.6.1. Época reprodutiva	60
3.6.2. Categoria da égua dadora.....	60
3.6.3. Endometrite pós inseminação artificial	61
3.7. Outras variáveis com efeito significativo na eficiência de programas de transferência de embriões	61
3.7.1. Incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios.....	61
3.7.2. Incidência de endometrite pós inseminação artificial	61
3.7.3. Incidência de ovulações múltiplas	62
4. Conclusões	63

V. Bibliografia	64
-----------------------	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Influência da época reprodutiva sobre a taxa de ovulação	32
Gráfico 2: Influência da idade da égua dadora na taxa de ovulação	33
Gráfico 3: Influência da categoria da égua dadora na taxa de ovulação	33
Gráfico 4: Influência do nº do ciclo éstrico na taxa de ovulação	34
Gráfico 5: Influência do diâmetro do folículo dominante na taxa de ovulação	35
Gráfico 6: Influência do tratamento indutor de ovulação na taxa de ovulação	35
Gráfico 7: Influência da categoria da égua dadora na taxa de embriões recolhidos	36
Gráfico 8: Influência do nº do ciclo éstrico na taxa de embriões recolhidos	37
Gráfico 9: Influência do nº de inseminações artificiais / ciclo na taxa de embriões recolhidos	37
Gráfico 10: Influência do nº de ovulações / ciclo na taxa de embriões recolhidos	38
Gráficos 11 e 12: Influência da lateralidade e sincronia das ovulações na taxa de embriões recolhidos	38
Gráficos 13 e 14: Influência da presença de endometrite pós inseminação artificial na taxa de embriões recolhidos e interação entre a presença de endometrite pós inseminação artificial e a categoria da égua dadora na taxa de embriões recolhidos	39
Gráfico 15: Influência da categoria da égua dadora na eficiência da recolha	40
Gráfico 16: Influência do nº do ciclo éstrico na eficiência da recolha	41
Gráfico 17: Influência do tratamento indutor de ovulação na eficiência da recolha	41
Gráfico 18: Influência do nº inseminações artificiais / ciclo na eficiência da recolha	42
Gráfico 19: Influência do nº ovulações / ciclo na eficiência da recolha	42
Gráficos 20 e 21: Influência da lateralidade e sincronia das ovulações na eficiência da recolha	43
Gráficos 22 e 23: Influência da presença de endometrite pós inseminação artificial na eficiência da recolha e interação entre a presença de endometrite pós inseminação artificial e a categoria da égua dadora na eficiência da recolha	44
Gráfico 24: Influência do nº de embriões recolhidos na eficiência da recolha	44
Gráfico 25: Influência da época reprodutiva na taxa de gestação	46
Gráficos 26: Influência da categoria da égua dadora na taxa de gestação	46
Gráfico 27: Influência da presença de endometrite pós inseminação artificial na taxa de gestação	47
Gráfico 28: Influência da época reprodutiva na taxa de mortalidade embrionária	48
Gráfico 29: Influência da categoria da égua dadora na taxa de mortalidade embrionária	48

Gráfico 30: Influência da presença de endometrite pós inseminação artificial na taxa de mortalidade embrionária	49
Gráfico 31: Influência da categoria da égua dadora na incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios	49
Gráfico 32: Influência da categoria da égua dadora na incidência de endometrite pós inseminação artificial.....	50
Gráfico 33: Influência da categoria da égua dadora na incidência de ovulações múltiplas....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Laboratório de Reprodução Equina, UNRC, Rio Cuarto.....	2
Figura 2: Centro de produção de embriões, Intendente Alvear, La Pampa	3
Figura 3: Clínica Veterinária de Santo Estêvão	4
Figura 4: Inseminação artificial com sémen criopreservado	6
Figura 5: Material utilizado na realização da lavagem uterina.....	6
Figura 6: Colocação do catéter de Foley e insuflação do balão	6
Figura 7: Recolha do líquido após lavagem do útero para um balão de Erlenmeyer	6
Figura 8: Filtração do líquido de lavagem para retenção do embrião no filtro.....	6
Figura 9: Observação dos embriões recuperados à lupa.....	6
Figura 10: Colocação dos embriões em palhinhas de criopreservação.....	7
Figura 11: Esquema das actividades de inseminação realizadas na FMV	7
Figura 12: Esquema das actividades de transferência de embriões desenvolvidas na exploração e na FMV	8

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Casuística extraordinária à rotina diária	3
Tabela 2: Casuística de foro clínico	5
Tabela 3: Casuística de foro cirúrgico	5
Tabela 4: Classificação dos centros de produção de embriões na Argentina.....	11
Tabela 5: Sistema de classificação de embriões equinos	14
Tabela 6: Parâmetros reprodutivos avaliados	29
Tabela 7: Variáveis analisadas com putativo efeito nos parâmetros reprodutivos	30
Tabela 8: Visualização global dos resultados obtidos	31
Tabela 9: Tabela descritiva da influência da época reprodutiva, categoria e presença de endometrite pós - inseminação na taxa de gestação e na taxa de mortalidade embrionária	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µm – micrómetro

ACTH – AdrenoCortico Tropin Hormone; hormona adrenocorticotrófica

APSL – Associação portuguesa de criadores do cavalo Puro Sangue Lusitano

BSA - Bovine Serum Albumin; soro de albumina bovina

CL – Corpo Lúteo

EMS – Equine Metabolic Syndrome

EPE – Extracto Pituitário Equino

ER – Eficiência da Recolha

EUA – Estados Unidos da América

EV - EndoVenosa

FEI – Federação Equestre Internacional

FHA – Folículo Hemorrágico Anovulatório

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

FSH – Follicle Stimulating Hormone; hormona estimulante folicular

gl – Graus de Liberdade

GLM – General Linear Models; modelos lineares gerais

GnRH – Gonadotropin – Releasing Hormone; hormona libertadora de gonadotrofina

hCG – Human Chorionic Gonadotropin; gonadotrofina coriónica humana

hMG – Human Menopausic Gonadotropin; gonadotrofina menopáusica humana

IA – Inseminação Artificial

IGF – Insulin-like Growth Factor

IGFBD – Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IM – IntraMuscular

IR – Insulino Resistência

LH – Luteinizing Hormone; hormona luteinizante

LSD – Least Significant Difference; menores diferenças significativas

MAJOVEM – Multivariate Analysis of Variance

ME – Mortalidade Embrionária

MEP – Mortalidade Embrionária Precoce

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

MV – Médico Veterinário

MRP – Movimento Rectilíneo Progressivo

n – nº de casos observados

na – não analisado

ng – nanograma
NS – Não Significativo
OM – Ovulações Múltiplas
 p – nível de significância
PBS – Phosphate Buffered Saline; tampão fosfato salino
PGF2 α – Prostaglandina F2 alfa
PO – Pós Ovulação
PPID – Pituitary *Pars Intermedia* Dysfunction
R – coeficiente de correlação
SPZ – espermatozóides
TE – Transferência de Embriões
TER – Taxa de Embriões Recolhidos
TG – Taxa de Gestação
TME – Taxa de Mortalidade Embrionária
TO – Taxa de Ovulação
TRE – Taxa de Recuperação Embrionária
UI – Unidade Internacional
UNRC – Universidade Nacional de Rio Cuarto

I. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é actualmente aceite como uma ferramenta útil no aumento do número de descendentes de éguas valiosas, na produção de poldros de éguas em competição sem que estas interrompam a sua carreira desportiva e na obtenção de poldros de éguas incapazes de levar uma gestação a termo (Vanderwall, 2000).

Entre a primeira referência sobre TE bem sucedida em equinos e os dias de hoje, em que a mesma se realiza em larga escala, distam cerca de 40 anos. No entanto, esta técnica não é ainda mais explorada devido a dois grupos de factores: à relutância por parte das associações de criadores em aceitar esta técnica ou restringir o número de descendentes obtidos pela mesma por época reprodutiva e, devido à dificuldade em superovular éguas e em criopreservar embriões equinos (Gordon, 2008).

As éguas idosas são uma constante neste tipo de programas, a maioria das vezes como dadoras de embriões, uma vez que são estas que já deram provas do seu valor e que já têm descendentes que demonstram a sua qualidade. No entanto, isto representa um enorme problema, uma vez que a eficiência reprodutiva nestas éguas é mais baixa, pois a idade da égua encontra-se relacionada com menores taxas de gestação e aumento da taxa de mortalidade embrionária (McKinnon & Squires, 2009).

Este trabalho surge por visita a alguns centros de produção de embriões e percepção da importância das éguas idosas em programas de TE, uma vez que é deste tipo de éguas que os proprietários mais ambicionam obter embriões. O objectivo consistiu na análise de dados de 3 épocas reprodutivas de um centro de produção de embriões de larga escala, na Argentina, com 225 éguas dadoras com idades compreendidas entre os 3 e os 29 anos, avaliar o impacto da utilização de éguas dadoras idosas em programas de TE e estudar formas que permitam aumentar a eficiência deste tipo de programas.

II. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. ACTIVIDADES REALIZADAS

O meu estágio decorreu em 3 locais diferentes durante o período entre 15 de Outubro de 2009 e 15 de Maio de 2010. Os locais onde realizei o estágio foram por ordem cronológica: Universidade Nacional de Río Cúarto (UNRC) – Laboratório de Reprodução Equina, Río Cúarto, Córdoba, Argentina; Clínica Veterinária de Santo Estêvão – Medicina e Cirurgia de Equinos, Santo Estêvão, Benavente; Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) / Universidade Técnica de Lisboa – Departamento de Clínica, Secção de Reprodução e Obstetrícia, Lisboa.

1.1. Argentina

O estágio foi realizado na Universidade Nacional de Río Cúarto, no Laboratório de Reprodução Equina, sob a orientação do Professor Doutor Luís Losinno, entre 15 de Outubro e 25 de Novembro de 2009. Para além deste local, tive ainda a oportunidade de visitar um centro de transferência de embriões em Intendente Alvear, La Pampa e participar em três congressos sobre equinos.

Figura 1: Laboratório de Reprodução Equina, UNRC, Río Cúarto



O dia começava às 6 da manhã no Laboratório de Reprodução Equina. Aí realizávamos o exame reprodutivo a todas as éguas ($n = 14$) do laboratório que passava por palpação rectal e ecografia transrectal. Seguidamente, e caso se justificasse, eram aplicados tratamentos para endometrite (ocitocina, lavagem uterina), sincronização de estro (progesterona, progestagénios) e indução de ovulação (deslorelina, gonadotrofina coriónica humana (hCG)). Caso se aplicasse, eram realizadas as recolhas e classificação dos embriões, não se realizando as transferências de embriões pois os últimos eram enviados para Buenos Aires para um estudo de criopreservação. Após o almoço colhia-se sêmen aos garanhões ($n = 2$), avaliava-se o mesmo, inseminavam-se as éguas que apresentassem à ecografia um

folículo com diâmetro maior ou igual a 35 mm e edema uterino. Duas a três vezes por semana deslocávamo-nos ao matadouro de equinos que se localizava a 3 minutos da faculdade e aí palpávamos e fazíamos ecografia às éguas que se encontravam para abate. No dia seguinte, íamos buscar os tractos reprodutivos de éguas que tinham sido abatidas nesse dia e estudávamos a sua anatomia, fisiopatologia, ultrassonografia, técnicas de biópsia e citologia.

Para além desta rotina, uma vez por semana visitávamos as coudelarias dos clientes, onde realizávamos todo o manejo reprodutivo anteriormente descrito e o manejo profilático (vacinações, desparasitações) e acompanhávamos ainda uma médica veterinária (MV), ex-ajudante do Laboratório, nas visitas aos seus clientes.

No centro de embriões em Intendente Alvear, a rotina era em tudo semelhante à do Laboratório, sendo as diferenças mais notórias a presença de 250 receptoras e 50 dadoras de embriões e a realização não só da recolha mas também da transferência dos embriões.

Figura 2: Centro de produção de embriões, Intendente Alvear, La Pampa

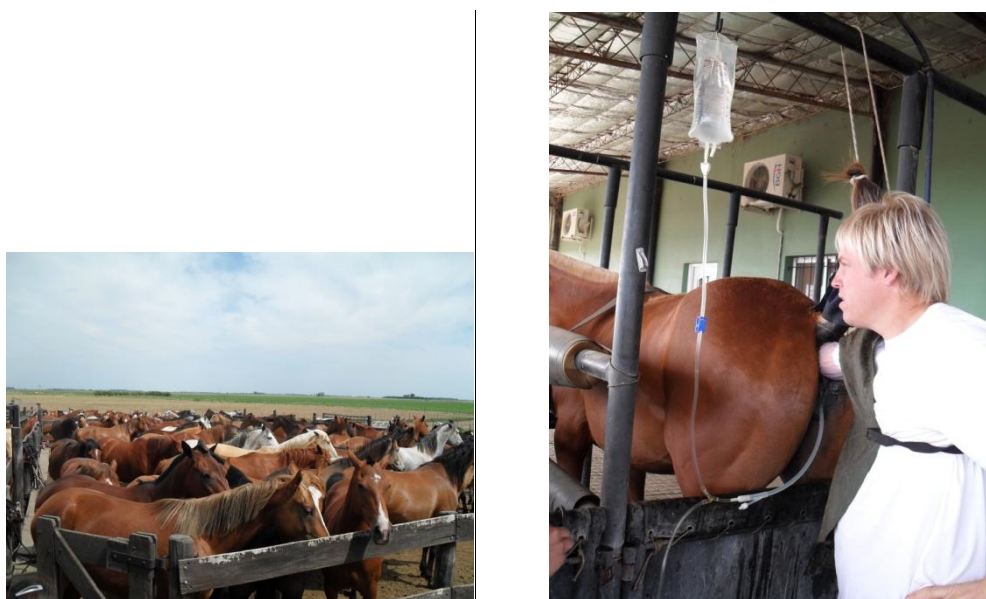


Tabela 1: Casuística extraordinária à rotina diária

Área de intervenção	Nº de casos observados (n)
Obstetrícia	5
Neonatologia	4
Aparelho músculo-esquelético	20
Aparelho respiratório	10

1.2. Santo Estêvão

O estágio decorreu na Clínica Veterinária de Santo Estêvão, entre 1 de Dezembro de 2009 e

14 de Março de 2010, sob a orientação do Dr. José Prazeres. As actividades decorreram tanto na clínica como em ambulatório. Aqui pude presenciar muitos casos das mais variadíssimas etiologias, sendo que as mais representativas foram as do foro gastrointestinal e músculo-esquelético. As actividades aqui desenvolvidas poder-se-ão incluir num dos seguintes grupos: clínica (aparelho digestivo, aparelho músculo-esquelético, aparelho respiratório, dermatologia, oftalmologia, reprodução e obstetrícia, neonatologia e pediatria), cirurgia e identificação e profilaxia, encontrando-se sumarizadas nas tabela 2 e 3.

Figura 3: Clínica Veterinária de Santo Estêvão



As principais actividades realizadas consistiram:

1.2.1. Cirurgia

Preparação pré-cirúrgica dos pacientes, auxílio da equipa cirúrgica durante os procedimentos, acompanhamento pós-cirúrgico dos pacientes – administração de medicamentos, exames clínicos, análises laboratoriais;

1.2.2. Clínica

Auxílio da equipa médica na recepção de urgências – histórias pregressas, exames clínicos, exames laboratoriais, procedimentos básicos (colocação de catéteres, administração de fluidos e medicamentos, entubações nasogástricas, palpações rectais); auxílio na realização de meios complementares de diagnóstico – raio X, ecografia, anestésias regionais; acompanhamento dos animais internados – exames clínicos, tratamentos, análises laboratoriais;

1.2.3. Ambulatório

Auxílio nos procedimentos realizados – cirurgias, ecografias, entubações nasogástricas, tratamentos, vacinações, desparasitações, colocação de microchips, recolha de amostras de sangue, entre outros.

Tabela 2: Casuística de foro clínico

Área de intervenção	Nº de casos observados
Aparelho digestivo	20 (21%)
Aparelho músculo-esquelético	26 (28%)
Aparelho respiratório	6 (7%)
Aparelho reprodutor	4 (4%)
Dermatologia	15 (16%)
Oftalmologia	2 (2%)
Hematologia	2 (2%)
Neonatologia e pediatria	3 (3%)
Profilaxia (vacinações)	14 (15%)
Identificação de animais (microchip e genótipo)	2 (2%)

Tabela 3: Casuística de foro cirúrgico

Área de intervenção	Nº de casos observados
Aparelho digestivo	6 (43%)
Aparelho músculo-esquelético	4 (29%)
Aparelho respiratório	1 (7%)
Aparelho reprodutor	1 (7%)
Neonatologia	2 (14%)

Para além destas actividades tive ainda a oportunidade de participar em dois concursos hípicas, como auxiliar da MV responsável pelo tratamento e do MV da Federação Equestre Internacional (FEI) que realiza os testes de *dopping*.

1.3. FMV – Secção de Reprodução e Obstetrícia

O estágio decorreu na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, na Secção de Reprodução e Obstetrícia, durante o período entre 15 de Março e 15 de Maio de 2010.

As actividades realizadas decorreram tanto na faculdade como numa exploração a que a secção dá assistência. As actividades desenvolvidas encontram-se esquematizadas nas figuras 11 e 12:

Figura 4: Inseminação artificial com sêmen criopreservado

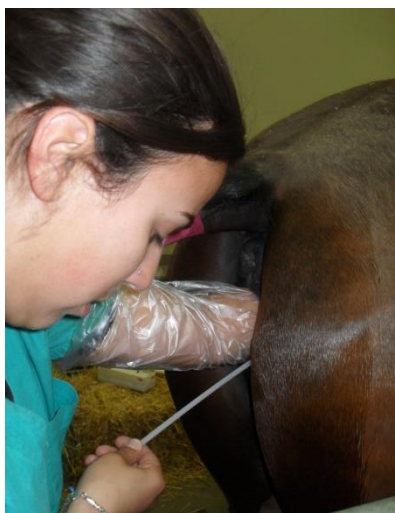


Figura 5: Material utilizado na realização de uma lavagem uterina para recolha de embriões



Figura 6: Colocação do catéter de *Foley* e insuflação do balão



Figura 7: Recolha do líquido após lavagem do útero para um balão de *Erlenmeyer*



Figura 8: Filtração do líquido de lavagem para retenção do embrião no filtro



Figura 9: Observação dos embriões recuperados à lupa: 2 blastocistos precoces e 1 óócito não fertilizado; ampliação 60x

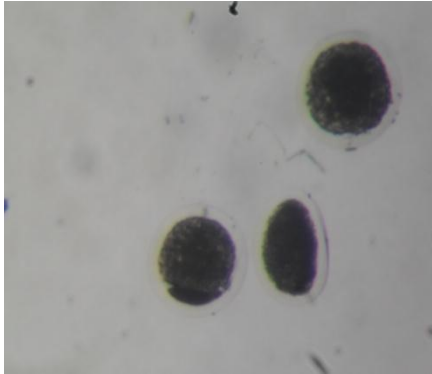


Figura 10: Colocação dos embriões em palhinhas de criopreservação



Figura 11: Esquema das actividades de inseminação artificial desenvolvidas na Faculdade de Medicina Veterinária

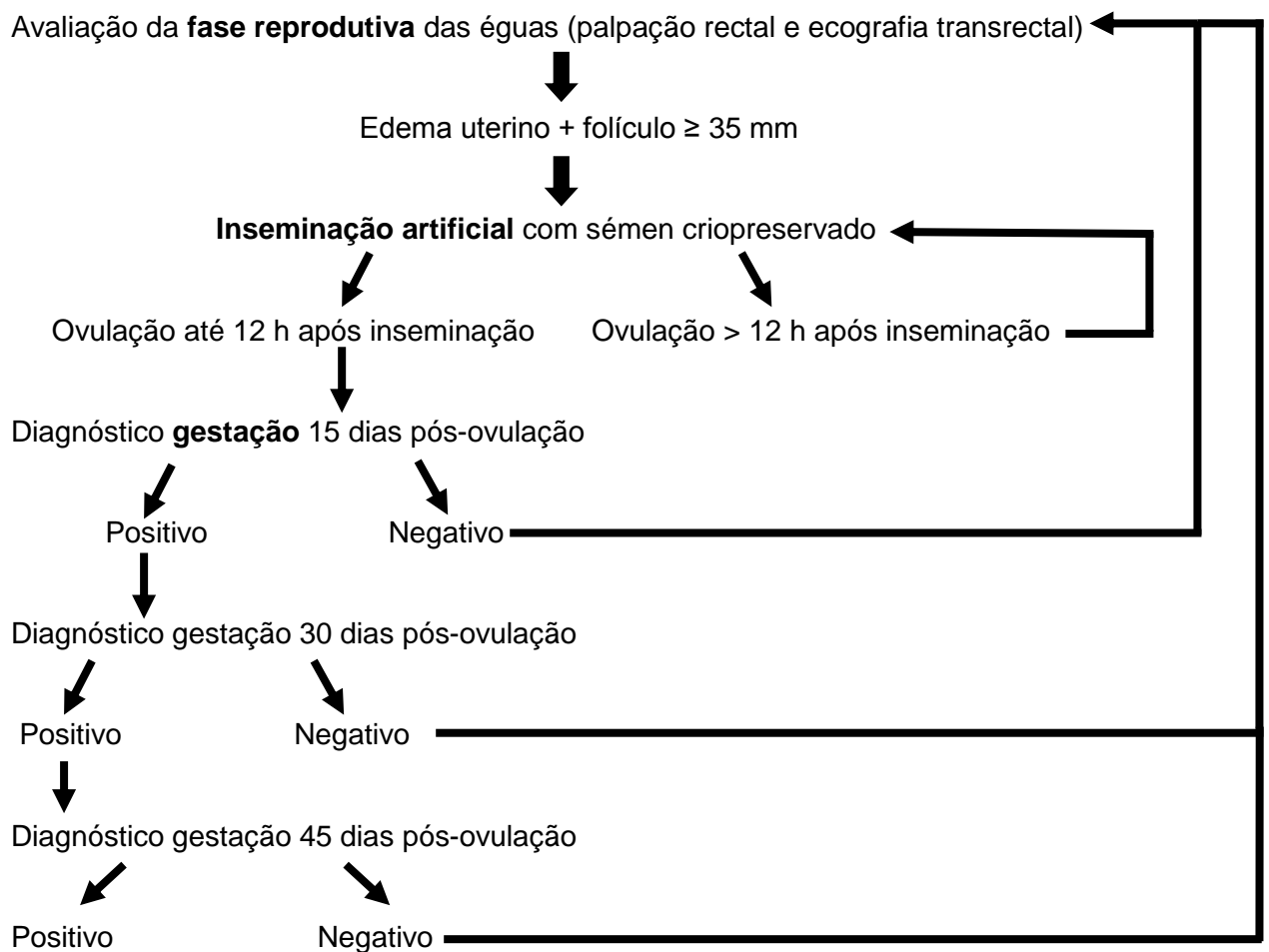
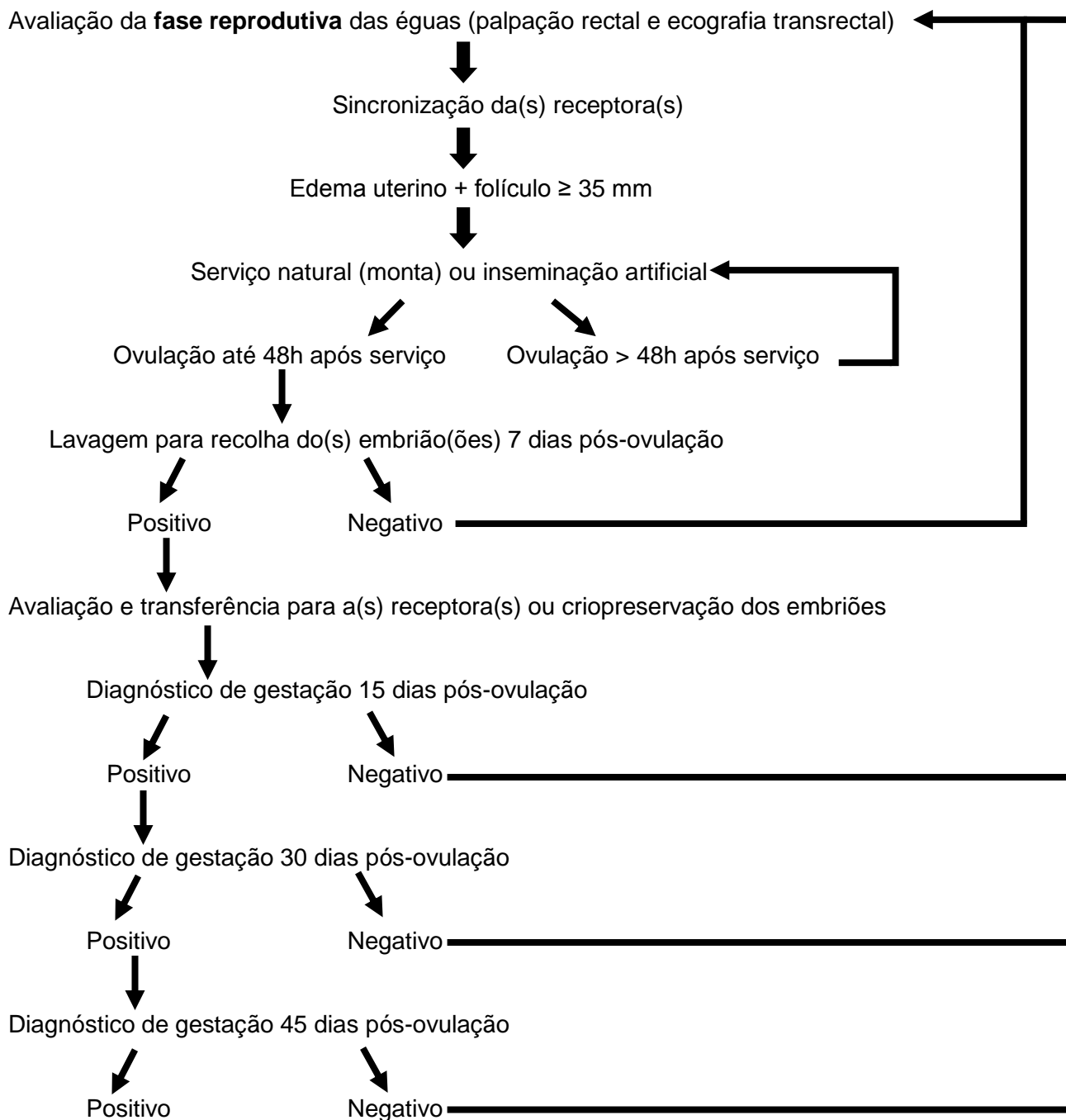


Figura 12: Esquema das actividades de transferência de embriões desenvolvidas na exploração e na Faculdade de Medicina Veterinária



III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

1.1. Breve nota histórica

A TE é uma técnica que consiste na colheita de um embrião de uma égua dadora e transferência do mesmo para o tracto reprodutivo de uma égua receptora com ovulação sincronizada (Losinno, 2009).

Os primeiros poldros obtidos por TE nasceram no Japão em 1973 e em Cambridge, Inglaterra em 1975, resultantes do trabalho de Oguri e de Allen e Rowson, respectivamente. O primeiro poldro nascido através de um embrião congelado foi obtido no Japão, no início da década de 80, graças ao trabalho de Yamamoto, Oguri e Tsutsumi e o primeiro poldro nascido pela técnica de TE não cirúrgica data de 1984, na Irlanda (Gordon, 2008).

Nos anos 80 inicia-se uma jovem etapa na TE, com impacto até aos dias de hoje: a criação de programas comerciais nos EUA e França, aumentando exponencialmente a produção de poldros obtidos por TE com todo o impacto económico que daí advém. Estima-se que, no final do século XX, eram produzidos anualmente cerca de 1500 poldros por TE nos EUA dos 300 000 poldros registados em todo o mundo (Squires, McCue & Vanderwall, 1999) em que a Argentina e o Brasil, representam cerca de 50% do mercado de TE mundial (Losinno & Alvarenga, 2007). Em 2009 encontravam-se em funcionamento 28 centros de TE na Argentina e obtiveram-se 6000 gestações na época de 2007-08, colocando este país em 3º lugar mundial a nível de produção de embriões (Losinno, 2009).

A expansão futura desta técnica, principalmente usada em cavalos de desporto, dependerá possivelmente do sucesso da criopreservação de embriões e do desenvolvimento de técnicas eficazes de superovulação em éguas, uma vez que são estes os dois parâmetros que limitam a expansão da técnica nos dias de hoje (Gordon, 2008).

No passado dia 18 de Junho de 2009 e após vários meses de conversações foi aprovada pela Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano (APSL) e homologada pela Fundação Alter Real a 16 de Março de 2010, a realização de TE na raça Puro Sangue Lusitano, com o limite de registo de 3 poldros/égua dadora/ano, o que poderá desencadear a evolução da técnica em Portugal, que até então se encontrava pouco expandida (Regulamento do Livro Genealógico do Cavalo da Raça Lusitana, anexo V, artigo 16º).

1.2. Indicações da técnica de transferência de embriões em equinos

A TE oferece muitas vantagens à indústria equina. Uma das maiores vantagens é a obtenção de poldros de éguas idosas e valiosas incapazes de levar uma gestação a termo (Vanderwall, 2000). Infelizmente, estas éguas têm menor probabilidade de produzir

embriões para transferência, em comparação com éguas saudáveis do ponto de vista reprodutivo, uma vez que os oócitos e os embriões provenientes destas têm maior probabilidade de morrer no oviducto ou subsequentemente à transferência (Carnevale & Ginther, 1995).

Outros benefícios desta técnica consistem no aumento da produção de poldros de éguas valiosas, permitindo um aumento da influência genética da progenitora e a obtenção de poldros de éguas com problemas não reprodutivos, mas que impeçam a gestação ou o parto. Esta técnica permite ainda que a égua se mantenha em competição e mesmo assim obtenha um poldro, mantendo-se apenas fora de competição durante o tempo necessário para obter um embrião. A TE tem ainda sido utilizada para obter poldros de éguas com 2 anos de idade, antecipando a produção de descendentes destas éguas em um ano, e na obtenção de descendentes de espécies em vias de extinção, tais como o cavalo *Przewalski* e as zebras. Por último, esta técnica é ainda útil na avaliação da fertilidade de garanhões e de vários tratamentos seminais, tais como refrigeração e congelamento, dando resultados ao fim de 7 dias PO, dia de recolha dos embriões da dadora (Stout, 2006).

1.3. Centros de produção de embriões

Na Argentina, os centros de produção de embriões podem ser classificados de acordo com o tipo e quantidade de embriões produzidos por temporada, sendo então classificados conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Classificação dos centros de produção de embriões na Argentina (adaptado de Losinno, 2005)

Centros esporádicos	Correspondem geralmente a trabalhos realizados <i>in situ</i> , nas coudelarias, clubes hípicas, ou eventualmente em clínicas, como um serviço complementar em programas reprodutivos ou em éguas em competição, geralmente de salto
Centros de pequena escala	Também como complemento de outra actividade como a inseminação artificial, diagnóstico e tratamento de infertilidade, pensões ou em coudelarias que realizam transferência de embriões nos seus próprios animais e raramente como serviço a terceiros. O nº de embriões por temporada geralmente é de 10 a 30 embriões e correspondem normalmente a cavalos de salto, Pólo e Quarto de Milha
Centros de média escala	São centros específicos, que também oferecem outros serviços como a inseminação artificial, partos assistidos, pensões. Têm instalações fixas específicas, com área suficiente para albergar 100 a 250 éguas receptoras por temporada, pessoal especializado a tempo inteiro e uma produção de 40 a 100 embriões por temporada
Centros de grande escala	Realizam apenas serviços de transferência de embriões, dispendo de áreas para 250 a 900 receptoras, instalações planeadas para realizar cerca de 10 a 30 lavagens uterinas diárias, laboratórios, depósitos, instalações para garanhões/sémen e uma quantidade importante de profissionais e auxiliares. Estima-se que a produção alcançada por este tipo de centros atinja entre os 100 e os 700 embriões por temporada

1.4. Programas de recolha e transferência de embriões

As áreas de maior preocupação para o MV na realização de programas de TE são o acompanhamento e cuidado com a dadora, a sincronização das receptoras e o sucesso da recuperação e transferência dos embriões (Hinrichs & Choi, 2005).

1.4.1. Manejo dadora – receptora(s)

O primeiro procedimento a realizar consiste na sincronização da ovulação entre a égua dadora e a(s) égua(s) receptora(s), seguido por IA da égua dadora. A égua receptora deverá ovular um dia antes até três dias depois da égua dadora, sendo o mesmo conseguido através da utilização de sincronizadores de estro tais como prostaglandina F2 α (PGF2 α), progesterona/progestagénios (Losinno, 2009) e indutores de ovulação tais como hCG, deslorelina (Samper, 2001) e busserelina (Bruyas *et al.*, 2000).

1.4.2. Recolha do embrião

O embrião em desenvolvimento, na égua dadora, migra do oviducto para o útero 5 (Hinrichs & Choi, 2005) a 5,5 dias (Losinno, 2009) PO, começando a crescer muito rapidamente. O embrião é normalmente recolhido 7 a 8 dias PO, sendo que muitos MV recolhem o embrião no dia 8 PO, pois nesta altura o mesmo já é visível a olho nu (Hinrichs & Choi, 2005) e porque muitos acreditam que embriões provenientes de éguas idosas não são recuperados quando a recolha é realizada no dia 7 PO porque o trajecto do embrião no oviducto demora mais tempo nestas éguas (Squires *et al.*, 1999). A recolha deverá ser realizada até ao dia 9 PO, uma vez que nesta altura o risco de dano embrionário é maior durante a recolha e transferência, devido ao aumento de tamanho do embrião e da eclosão da zona pelúcida (Squires & Seidel, 1995).

1.4.2.1. Técnica não cirúrgica

A égua dadora de embriões é colocada numa manga, a cauda é ligada e a zona perineal lavada cuidadosamente primeiro com sabão desinfectante e por fim com uma solução iodada. Todo o material utilizado para realização da lavagem e que contacte com o aparelho reprodutor da égua deve encontrar-se devidamente esterilizado. O técnico coloca uma luva de palpação esterilizada na sua mão e introduz um catéter de *Foley* através do cérvix. A passagem do catéter através do cérvix deve ser realizada cuidadosamente, de modo a não o dilatar excessivamente. Quando o catéter se encontrar no corpo do útero o balão é insuflado com aproximadamente 50 – 75 mL de ar e, após insuflado, o catéter é puxado até ao os cervical interno. Em cada lavagem são utilizados 3 a 4 litros de PBS (tampão fosfato salino) ou Lactato de Ringer (Losinno, 2009), e a cada litro de PBS podem (Squires & Seidel, 1995) ou não (Losinno, 2009) ser adicionados 10 mL (1%) de soro fetal bovino ou até 4% de BSA (soro de albumina bovina) (Tainturier, Bruyas, Dumont, Fieni & Escoufflaire, 1989). A solução deve encontrar-se aproximadamente a 37°C no momento em que é realizada a lavagem. É colocado 1 litro de PBS num balão de Erlenmeyer, que se liga ao catéter, e por gravidade a solução entra no útero. O útero é depois massajado por via rectal de modo a que a solução de lavagem percorra todo o útero e para permitir que o embrião

seja captado pela sonda. O meio é recolhido por gravidade através do mesmo sistema, por manuseamento dos *clamps* (encerrando o *clamp* que permite a entrada de solução para o útero e abrindo o *clamp* que permite a saída da solução do útero para a proveta de recolha). É colocado um filtro de 75 µm, conectado à extremidade inferior do sistema, onde o embrião é retido, e a solução de lavagem é recolhida numa proveta de modo a saber que quantidade se extraiu em relação à que se colocou. O procedimento é realizado normalmente 2 a 3 vezes, mas pode ser executado tantas vezes quanto necessário, conforme a experiência do operador. Pode ser administrada ocitocina de modo a estimular a contracção uterina (McCue, Niswender & Macon, 2003). Cerca de 50 mL de meio de lavagem devem ser mantidos no filtro onde se encontra o embrião, no final da lavagem. Após o 3º ou 4º litro recolhido o balão é desinsuflado, o catéter retirado do útero e a quantidade de solução presente no catéter e no tubo de saída drenada para o filtro.

1.4.3. Localização e avaliação do embrião

A solução presente no filtro de recolha é passada para uma placa de Petri esterilizada e o filtro é lavado com 60 mL de PBS (contidos numa seringa) e transferidos depois para outra placa esterilizada (Squires & Seidel, 1995). Um embrião com 8 dias é normalmente visível a olho nu. No entanto, para embriões com menos de 8 dias, com atraso no desenvolvimento ou provenientes de ovulações múltiplas (OM) (geralmente mais pequenos), é necessária uma lupa, para encontrar o embrião. O uso de lupa permite ainda a classificação do embrião, segundo a sua qualidade (tabela 5) e o seu estadio de desenvolvimento (mórula, blastocisto precoce, blastocisto e blastocisto expandido). As placas são então observadas em ampliação 7x ou 10x e quando encontrado o embrião, este é transferido para uma placa mais pequena (35 mm) que contém PBS + 10% de soro fetal bovino (Squires & Seidel, 1995). Em caso de falha na fertilização, o oócito é normalmente retido no oviducto (Betteridge & Mitchell, 1974), não sendo recolhido. Se um oócito é encontrado, é assumido que provém de um ciclo anterior, tendo acompanhado o embrião na sua passagem para o útero. Os oócitos são diferenciáveis dos embriões pela sua aparência mais granulosa, acelular e lisa. O importante a reter é que no caso de apenas ser encontrado um oócito, o filtro deve ser jovemmente reavaliado de forma a encontrar o embrião em falta.

Tabela 5: Sistema de classificação de embriões equinos (adaptado de Squires & Seidel, 1995)

Grau 1	Excelente – embrião ideal, esférico, constituído por células de tamanho, cor e textura uniformes
Grau 2	Bom – imperfeições mínimas, tais como poucos blastómeros extrusados, forma irregular ou separação trofoblástica
Grau 3	Razoável – sem problemas graves, presença de blastómeros extrusados, células degeneradas ou blastocelo colapsado
Grau 4	Inferior/Mau – problemas graves, blastocelo colapsado, nº elevado de blastómeros extrusados, células degeneradas mas com aparência de massa embrionária viável
Grau 5	Morto ou não fertilizado – oócitos não fertilizados ou embriões totalmente degenerados

1.4.4. Transferência transcervical do embrião

A transferência a fresco deve ser realizada o mais rápido possível. Há relativamente pouco tempo os embriões eram transferidos cirurgicamente através de laparotomia através da linha média e sob anestesia geral (Allen, 1982) ou na zona do flanco sob anestesia local (Squires, Garcia & Ginther, 1985). No entanto, hoje em dia a transferência cirúrgica está praticamente banida, tendo sido substituída pela técnica transcervical, que é muito menos invasiva, mais rápida e barata. Além disso, operadores experientes conseguem obter taxas de gestação (TG) acima dos 80% se usadas receptoras em condições apropriadas (Losinno, Aguilar & Lisa, 2001; Jasko, 2002). Tal como na técnica de recolha, o técnico deve colocar uma luva de palpação estéril e uma luva de látex também estéril por cima da luva de palpação. As receptoras devem ser colocadas em mangas e a zona perineal higienizada de modo idêntico ao descrito para a dadora. Os embriões são normalmente transferidos em meio apropriado, disponível comercialmente, no qual o embrião é lavado previamente em várias passagens. A transferência é realizada utilizando uma pipeta tipo *cassou*, após introduzir o embrião numa palhinha de 0,25 ou 0,5 ml, consoante o tamanho do mesmo. A palhinha é preenchida com 3 colunas de líquido separadas por espaços com ar, encontrando-se o embrião na segunda coluna de líquido. A técnica de manipulação da pipeta difere de operador para operador, mas o mais importante é assegurar que a pipeta entra no útero sem que arraste consigo contaminantes e com o mínimo de traumatismo. A contaminação é minimizada pela colocação da pipeta numa camisa de plástico estéril, que é introduzida até ao os externo do cérvix. Uma vez no cérvix, a camisa é puxada para trás, avançando a pipeta através da porção cranial do cérvix até ao lúmen uterino. Parece importante não dilatar o cérvix digitalmente durante a transferência assim, a pipeta deve ser introduzida manualmente no

cérvix enquanto a *portia vaginalis* é estabilizada com os dedos, externamente ao os. Se necessário, a pipeta pode ser guiada por palpação rectal e a receptora pode ser tranquilizada de modo a ajudar no relaxamento cervical e a não ocorrerem traumatismos durante a transferência (Hinrichs & Choi, 2005).

1.5. Eficiência da transferência de embriões

Losinno (2009) refere que os factores com maior importância na eficiência de programas de TE incluem: fertilidade do garanhão, dificuldade na superovulação das éguas dadoras, idade e condição reprodutiva da égua dadora, correcta detecção da ovulação, condição reprodutiva, nutricional, sanitária e idade das receptoras, experiência do operador e qualidade do embrião.

Muitos factores devem ser considerados no planeamento de um programa de TE, incluindo o custo do procedimento, história reprodutiva da égua dadora, o garanhão ou sêmen a usar, orientações de registo da raça, valor potencial do poldro e o nº de gestações desejadas. Regra geral, o poldro deverá ser avaliado em aproximadamente duas vezes o custo da TE, embora em certos casos o cliente deseje descendência da égua dadora descurando os custos. O conhecimento profundo da história reprodutiva da égua deve permitir à equipa estimar o tempo necessário para obter uma gestação (Squires & Seidel, 1995).

Losinno (2009) refere que, sob condições ideais, (dadoras, receptoras, garanhões férteis e pessoal envolvido competente), é possível esperar taxas de recuperação embrionária (TRE) e de gestação (TG) entre os 50 e os 80%, determinando taxas de eficiência do programa entre os 25 a 65%. Já quando são utilizadas éguas sub-férteis a TRE e a TG são relativamente mais baixas, variando entre os 20 – 30% *versus* 60 – 80% em éguas normais. Vogelsang & Vogelsang (1989) reportaram TG de 69% em éguas virgens, 60% em éguas pós-parto e 49% em éguas sub-férteis.

Esta técnica permite obter em média, 4 poldros por ano por égua, havendo mesmo relatos de éguas que na mesma temporada reprodutiva alcançaram 14 gestações, mesmo sem utilizar protocolos de superovulação (Losinno, 2009).

A TG após transferência transcervical parece estar relacionada com o técnico que a realiza, e é normalmente mais elevada para clínicos que a realizam em grande número. Este factor pode ser facilmente superado com o envio do embrião recolhido para um centro de transferência comercial onde é transferido para a receptora (Hinrichs & Choi, 2005).

1.6. Limitações da transferência de embriões na espécie equina

Neste momento, existem duas principais limitações na técnica de TE, sendo elas a dificuldade em superovular éguas dadoras e a dificuldade em criopreservar embriões (Stout, 2006).

1.6.1. Superovulação

Por norma, as éguas ovulam um único folículo por ciclo éstrico, no entanto OM podem ocorrer espontaneamente (Hunt, Aguilar, Sporleder & Losinno, 2005). Os dados referem que a ocorrência de OM varia entre 4 e 43% (Ginther, 1992; Remy *et al.*, 1997) consoante a raça, idade, estado reprodutivo, genética, nutrição e época em questão. Assim sendo, a superovulação torna-se num elemento fundamental em programas de TE uma vez que se encontra associada a um aumento do nº de embriões recolhidos e consequentemente a um maior nº de gestações nas receptoras a menor custo (Squires, McKinnon, Carnevale, Morris & Nett, 1987; Losinno *et al.*, 2001), aumentando grandemente a eficiência destes programas.

De grande importância para a eficiência dos programas de TE, torna-se ao mesmo tempo uma enorme limitação, uma vez que ao longo dos anos têm sido testados vários fármacos que possam estimular a superovulação, no entanto com pouco êxito, apenas conseguindo aumentar para o dobro a taxa de ovulação (TO) (Squires *et al.*, 1987). Alguns dos problemas na superovulação das éguas incluem: nº inconsistente de éguas responsivas aos tratamentos superovulatórios, diminuto nº de fármacos disponíveis comercialmente, custo elevado deste tipo de tratamentos e possível baixa viabilidade dos embriões obtidos por OM (McKinnon & Squires, 2007).

Os tratamentos estudados e usados na prática são vários, encontrando-se entre eles preparados de FSH pituitária porcina, extracto pituitário equino (EPE), imunização contra a inibina (Stout, 2006) e gonadotrofina menopáusica humana (hMG) (Losinno, Vollenweider, Castañeira & Pasqualini, 2007).

1.6.2. Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões equinos não tem sido bem sucedida, uma vez que no geral, estes embriões parecem tolerar melhor o congelamento/descongelamento durante os estádios de mórula ou blastocisto precoce, com diâmetro de cerca de 200µm. O problema desta situação é que embora os embriões de 5 ou 6 dias sigam as condições acima descritas, apresentam por sua vez TRE muito baixas quando comparadas com embriões de 7 ou 8 dias e os últimos por sua vez já são demasiado grandes (400 a 1200 µm de diâmetro) e com isso menos tolerantes aos processos actuais de congelamento/descongelamento (Squires, Carnevale, McCue & Bruemmer, 2003). A razão apontada para a reduzida tolerância dos blastocistos à criopreservação ainda não se conhece, mas parece estar relacionada com a formação de uma cápsula acelular que se forma por baixo da zona pelúcida, entre os 6 e os 7 dias e que prejudicará o movimento do crioprotector no embrião (Squires *et al.*, 1999). Assim sendo, o desenvolvimento de jovens técnicas de

criopreservação poderá aumentar a viabilidade comercial da criopreservação de embriões equinos.

2. A ÉGUA DADORA IDOSA

2.1. Importância da égua dadora idosa em programas de transferência de embriões

Em muitas situações as éguas idosas podem ser mais valiosas devido às provas já prestadas e que comprovam o seu valor, sendo comum encontrar éguas com mais de 20 anos em programas de TE (Ball, 2000).

A idade e a história reprodutiva são provavelmente as peças de informação mais importantes que o MV pode ter quando examina uma égua. Deve-se perceber que as expectativas do proprietário são obter uma gestação no primeiro ciclo éstrico da égua, independentemente da sua idade ou história reprodutiva. Isto é ainda mais verdadeiro quando a égua tem 10 anos ou mais e teve uma carreira de sucesso, mas ainda permanece núlpara. Este tipo de éguas tende a acumular líquido no útero durante o estro, apresenta extensa dilatação glandular e falha no relaxamento cervical devido a fibrose ou aderências (Samper, 2008).

As éguas de meia idade começam a sofrer redução no seu potencial de fertilidade e alguns dos sinais que podem predizer que determinada égua é uma égua-problema são: intervalos interovulatórios irregulares; presença de líquido livre antes e/ou após IA; aumento significativo do edema uterino após IA; presença ou persistência de edema endometrial marcado PO. Samper (2008) considera uma égua como problema após a mesma ser servida em dois ciclos consecutivos com sêmen de qualidade e no tempo correcto, sem que fique gestante.

Para que a TE seja bem sucedida, são necessários vários requisitos relativamente ao aparelho reprodutor da égua dadora: crescimento folicular e ovulação de oócitos saudáveis; capacidade por parte do oviducto de fazer o transporte de gâmetas, auxiliar na fertilização e transportar o embrião para o útero; capacidade uterina para promover um ambiente adequado à sobrevivência e desenvolvimento do embrião até à sua recolha; capacidade de funcionamento adequado do cérvix. Assim sendo, éguas com anomalias que não permitam a concepção ou a manutenção do embrião, tais como endometrite persistente pós-serviço, lacerações cervicais irreparáveis ou cicatrizes uterinas/oviductais após distócia, não são boas candidatas para este tipo de técnica (Coutinho da Silva, 2008).

A eficiência reprodutiva nas éguas idosas é mais baixa, pois a idade da égua encontra-se relacionada com menores TG e aumento da taxa de mortalidade embrionária (TME). Tal é devido a um aumento na susceptibilidade à infecção, bem como uma maior incidência de endometrose, formação de quistos uterinos e redução do tônus e contracção do útero. A funcionalidade dos ovários, o seu peso, o nº de folículos desenvolvidos, a viabilidade dos

oócitos, morfologia dos embriões e o correcto funcionamento dos oviductos também representam factores com influência nestas taxas, uma vez que sofrem alterações com o avançar da idade (Blanchard *et al.*, 2003).

Abaixo revêem-se sumariamente os processos patológicos que podem condicionar a eficiência da TE em éguas dadoras idosas.

2.2. Ciclos irregulares

Ciclos irregulares são caracterizados por uma fase lútea curta ou prolongada. Normalmente, as éguas ovulam a intervalos de 19 a 22 dias, durante a temporada reprodutiva. O útero não grávido liberta prostaglandina por volta do dia 16 PO, no entanto, bactérias, microrganismos ou material estranho (por ex. urina) podem inibir, retardar ou estimular a produção de prostaglandina uterina, alterando o intervalo interovulatório. Uma égua, no dia 14/15 PO, em estro e que apresente folículos de grandes dimensões e presença evidente de edema uterino deve ser considerada anormal, da mesma forma que, quando conhecida a data de ovulação, uma égua que no dia 18/19 PO não apresente um folículo dominante nem edema uterino também o é. Este tipo de sinais pode ser o primeiro indicador da saúde uterina. Sem descurar isto, há situações fisiológicas e patológicas que podem alterar o intervalo interovulatório, das quais são exemplo a administração de PGF2 α para encurtar a fase lútea e o desenvolvimento de folículos hemorrágicos anovulatórios (Samper, 2008).

2.3. Folículos hemorrágicos anovulatórios

Designa-se por folículo hemorrágico anovulatório (FHA) o hematoma formado no antro do folículo e que corresponde à não-ovulação do mesmo (Ginther, Gastal, Gastal & Beg, 2006). Desconhecem-se as causas exactas para a ocorrência de FHA. Encontra-se descrita uma correlação entre este acontecimento e a administração de indutores da ovulação, como a hCG e a deslorelina, mas o mesmo também ocorre em éguas não tratadas e a incidência não é elevada o suficiente para considerar a inutilização deste tipo de fármacos (McCue & Squires, 2002). Num estudo recente, Ginther, *et al.* (2006) verificaram que existiam níveis mais elevados de estrogénio no líquido folicular de éguas com FHA. A incidência de FHA é também mais frequente durante as fases de transição, daí o nome também atribuído a este tipo de folículos – folículos de Outono – e em éguas idosas (Mottershead, 2007). Segundo um estudo recente (Ginther, Gastal, Gastal & Beg, 2007) este tipo de folículos apresenta uma incidência de 8 a 10% durante a época reprodutiva, nomeadamente e segundo faixas etárias, 4,4% em éguas entre os 6 e os 10 anos de idade e 13,1% em éguas entre os 16 e os 20 anos, tendo-se ainda observado que o último grupo de éguas apresentava mais do que um FHA na mesma época reprodutiva.

A importância deste tipo de folículos é o facto dos mesmos não serem férteis, uma vez que

não ocorre ovulação, e portanto o ciclo no qual o mesmo ocorreu é perdido, atrasando todo o processo em questão, ou no caso específico da TE, uma colheita de embriões. Cerca de 85% dos FHA desenvolvem tecido lúteo, evidenciado por um aspecto anecogénico à ecografia e por níveis elevados de progesterona (>1 ng/ml), podendo desta forma responder ao tratamento com PGF 2α e sofrer luteólise. Os restantes 15% permanecem sem sofrer qualquer alteração, por períodos que podem atingir os 100 dias, resultando em comportamento de anestro e grandes intervalos interovulatórios (Mottershead, 2007).

É difícil prever a formação de FHA, mas segundo Samper (2008), o primeiro indicador do possível desenvolvimento de um FHA é a ausência de resposta aos indutores de ovulação, 48 a 96 horas após a sua administração. O mesmo autor refere que o uso do *doppler* na avaliação da dinâmica vascular pode também ser uma ferramenta importante na determinação do padrão vascular do corpo lúteo e dos FHA, uma vez que as alterações na perfusão vascular de um folículo dominante podem ser quantificadas pelo número de pixéis coloridos na imagem sendo assim possível tentar prever se o folículo é ou não ovulatório bem como predizer quando ocorrerá a ovulação.

2.4. Endometrite

A condição inflamatória do útero, conhecida como endometrite, pode ser classificada em aguda, crónica, activa, sub-clínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, induzida pelo serviço, persistente, entre outras (Hurtgen, 2006). Esta condição causa redução substancial na fertilidade da égua e para a diagnosticar é de primeira importância identificar os factores predisponentes.

A endometrite aguda é caracterizada por uma afluência de neutrófilos para o interior do estroma endometrial e do lúmen uterino. As duas formas primárias de endometrite aguda são: endometrite persistente induzida pelo serviço e a endometrite infecciosa. Ambas as formas são caracterizadas por acumulação de líquido intra-uterino que pode afectar adversamente a fertilidade. Esta diminuição da fertilidade resulta do efeito sobre a motilidade dos espermatozóides e/ou a sua viabilidade caso o serviço seja realizado com o útero inflamado e/ou sobre a viabilidade embrionária precoce caso a endometrite persista além de 5 dias PO, quando o embrião chega ao lúmen uterino e o corpo lúteo (CL) se torna sensível à PGF 2α (Watson, 2000). Foi demonstrado que a inflamação aguda associada às recolhas de líquido intra-uterino durante o diestro aumenta a incidência de perda embrionária precoce, da mesma forma que a incidência deste parâmetro também é maior em éguas com história de endometrite, quando comparadas com éguas sem história desta afecção (Vanderwall, 2008). Heuer, King, Gardiner, Ferreira-Dias & Nequim (1993), utilizando um sistema de bioensaio interespecies (murino – equino), investigaram o efeito da secreção do endométrio equino na sobrevivência embrionária, concluindo que o

desenvolvimento embrionário no líquido uterino de éguas com biópsia endometrial de categoria I não diferiram do do grupo controlo, que o desenvolvimento embrionário no líquido uterino de endométrios de categoria II foi menor que nos de categoria I e III e que a quantidade de infiltração de linfócitos foi inversamente proporcional à taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões em endométrios tipo I, tipo II e tipo III.

O serviço (natural ou artificial (IA)) induz uma reacção inflamatória imediata no útero, reacção esta de carácter fisiológico contra matéria estranha ao organismo. Na maioria das éguas esta inflamação desaparece em 1 a 2 dias, mas em éguas susceptíveis à endometrite induzida pelo serviço ocorre acumulação de líquido no útero, como resultado do *clearance* comprometido dos produtos inflamatórios. Os factores predisponentes para a ocorrência de endometrite pós-serviço incluem: diminuição das contracções do miométrio, drenagem linfática deficiente, útero largo e descaído e incompetência cervical (Pycock, 2009).

A endometrite crónica é mais frequentemente encontrada em éguas idosas (>12 anos), multíparas, com má conformação perineal, podendo também ocorrer em éguas susceptíveis a endometrite induzida pelo serviço, em dadoras de embriões manipuladas frequentemente para recolha de embriões e em éguas com incompetência cervical (LeBlanc, 2008). Ao contrário da endometrite aguda, a endometrite crónica é caracterizada por uma afluência de linfócitos para áreas localizadas do estroma endometrial (Vanderwall, 2008). O tratamento deve passar pela eliminação do agente em causa, através de lavagens uterinas, antimicrobianos e ainda pela reparação dos defeitos anatómicos (LeBlanc, 2008).

2.5. Endometrose

Esta condição é diagnosticada pela presença, aquando da avaliação histológica de biópsias uterinas, de glândulas degeneradas (não funcionais) e/ou quísticas, observadas sob a forma de “ninhos” rodeados por lâminas de tecido fibroso (Inoue *et al.*, 2000). Observa-se ainda fibrose periglandular e perivascular e menos frequentemente fibrose difusa, angiopatia e lacunas linfáticas (“piscinas” rodeadas por células endoteliais linfáticas). A observação de fibrose difusa é normalmente indicativa de mau prognóstico, ou seja a manutenção de gestações torna-se praticamente impossível (McCue, 2008). As biópsias endometriais são normalmente classificadas em categorias de I a III, com base nas características histológicas (grau I – endométrio normal, com inflamação ou fibrose mínima, grau III – alterações inflamatórias e/ou fibróticas severas (Kenney, 1978)). Ferreira-Dias, Nequim, & King (1999) avaliaram biópsias endometriais classificadas nas categorias I a III através de microscopia óptica e electrónica de transmissão e identificaram nas biópsias de categoria III a presença de grande nº de células com estruturas degeneradas, menos organelos e menos cílios no lúmen das glândulas. Esta categoria de biópsia apresentava ainda uma lâmina própria constituída por extenso tecido fibroso e muitas células inflamatórias na maioria das

camadas teciduais, associando estas alterações estruturais a um dos factores com influência na diminuição da fertilidade em éguas com esta categoria endometrial.

As alterações endometriais degenerativas crónicas são progressivas e encontram-se associadas ao normal processo de envelhecimento e aos efeitos hormonais cíclicos. A estimulação continua por diferentes tipos de agentes (sémen, microrganismos, alterações físicas) acelera a progressão da endometrose, influenciando o declínio de fertilidade observado em éguas a partir de determinada idade (Ricketts, 2008).

Estas alterações degenerativas são frequentemente observadas em éguas com perdas de gestação repetidas ou gestações prolongadas com dismaturidade fetal. O grau de degenerescência parece estar associado à idade e em termos gerais verifica-se que éguas até 9 anos não devem apresentar sinais, éguas até aos 13 anos devem apresentar apenas sinais ligeiros, éguas até aos 15 anos sinais moderados e éguas com mais de 17 anos podem apresentar sinais avançados de alterações degenerativas crónicas (Ricketts & Alonso, 1991).

Sabe-se que éguas que iniciaram a sua vida reprodutiva em idade já avançada, como acontece com as éguas de desporto, que apenas iniciam a vida reprodutiva após o fim da carreira desportiva, apresentam frequentemente alterações degenerativas endometriais excessivamente marcadas para o que é considerado normal para a sua idade, o que conduz a grandes dificuldades em alcançar com sucesso a primeira gestação. Contrariamente, éguas idosas, com partos anuais desde os 4 anos de idade, sem perdas e sem grandes dificuldades obstétricas, apresentam alterações degenerativas em menor grau às consideradas normais para a sua idade. Isto provavelmente deve-se à interrupção da circulação dos estrogénios provocada pela gestação e que tem um efeito protector na integridade glandular endometrial (Samper, 2008).

Assim sendo, o manejo reprodutivo das éguas deve passar não só pelo manejo ginecológico e obstétrico mas também por evitar o descanso reprodutivo prolongado. Além disso, quando se verificar que o grau de alterações degenerativas é considerado excessivo para a idade, pode ser tentado o tratamento com curetagem mecânica endometrial. Este tratamento permite melhoras no aspecto histopatológico e na fertilidade, principalmente em éguas com menos de 17 anos (Ricketts & Troedsson, 2007)

2.6. Alterações endócrinas e metabólicas

As principais doenças endócrinas que afectam a função reprodutiva em éguas são a insulino-resistência (IR), o síndrome de Cushing e o síndrome metabólico equino. Define-se IR como a diminuição da capacidade de resposta à insulina, síndrome de Cushing (PPID – *pituitary pars intermedia dysfunction*) ou hiperadrenocorticismismo como a produção excessiva de corticoesteróides pela glândula adrenal e síndrome metabólico equino (EMS – Equine

metabolic syndrome) como a presença de insulino-resistência sem presença detectável de PPID (Douglas, 2009).

As manifestações clínicas destas doenças aparecem sob a forma de imunossupressão associada a endometrites crónicas, laminites, dificuldade em manter as suturas de Caslick, períodos anovulatórios, desenvolvimento de FHA, abortos, falhas na concepção ou produção de embriões viáveis e pseudolactação (Douglas, 2009).

Frequentemente é difícil determinar se um animal apresenta EMS ou PPID, alguns animais poderão ter ambos. O sinal clínico mais importante associado ao EMS e à IR é a obesidade, uma vez que aqueles ocorrem mais frequentemente em animais obesos, mas nem todos os equinos obesos apresentam IR. É provável, como referido nos humanos, uma associação entre predisposição genética, disponibilidade de alimentos e tipo de exercício. Outros sinais que podem levar à suspeita deste tipo de patologia incluem: hirsutismo, polidipsia ou poliúria e infecções bacterianas ou fúngicas recorrentes (Douglas, 2009).

Os testes de diagnóstico incluem: teste de supressão de dexametasona, medição dos níveis plasmáticos de ACTH, cortisol e insulina. Éguas tratadas com Pergolide, agonista da dopamina, devem ser monitorizadas frequentemente uma vez que doses > 2 mg/dia deste composto podem inibir a secreção de GnRH, resultando em anestro (LeBlanc, 2008).

2.7. Mortalidade embrionária e patologia oviductal

Entende-se por morte embrionária a perda de gestação ocorrida entre a fertilização e os 40 dias de gestação (Vanderwall & Newcombe, 2007). Embora o diagnóstico desta seja hoje em dia mais frequente e precoce devido à utilização da ecografia transrectal, no entanto, o mesmo só é ainda possível a partir do dia 8-9 PO (Costa, L., comunicação pessoal, Março 30, 2010). O problema é então detectar perdas embrionárias que ocorram previamente a poderem ser diagnosticadas por ecografia (tal como acontece para TE) e diferenciar se ocorreu perda embrionária ou, se por sua vez, não houve fertilização (Vanderwall, 2008).

Este factor é importante em programas de TE uma vez que grande percentagem (20 a 30%) das mortes embrionárias precoces ocorre em éguas com mais de 18 anos de idade (Vanderwall, 2008). Ball, Little, Willman e Woods (1986) e Brinsko, Ball, Miller, Thomas e Ellington (1994) referem que a taxa de fertilização, baseada na taxa de clivagem de óvulos recuperados dois dias após fertilização, embora mais baixa em éguas idosas é ainda assim bastante elevada (> 90% em éguas jovens *versus* 85% [80 – 90%] em éguas idosas). No entanto, embora a TG no 2º dia seja semelhante em éguas jovens e idosas, no 4º dia após fertilização, há uma redução significativa na TG nas éguas idosas, sugerindo que o intervalo entre os 2 e os 4 dias após fertilização representa um período crítico na perda de gestação nas éguas idosas (Ball, 2000).

A TRE é bastante mais baixa em éguas idosas, o que pressupõe uma elevada TME antes

do dia 10 PO (entre dias 6 e 9). Ball *et al.*, (1986) e Ball, Little, Weber e Woods, (1989) referem TME em éguas jovens < 10%, comparado com valores que variaram entre 60 a 70% em éguas idosas. Além disso, Ball (2000) refere que os blastocistos destas éguas apresentam mais defeitos morfológicos e menores taxas de sobrevivência após transferência para éguas receptoras saudáveis. Uma vez que o embrião equino chega ao útero no dia 5 / 5,5 PO, não se consegue ainda perceber se o declínio no número e viabilidade dos blastocistos de éguas idosas se encontra relacionado com o ambiente uterino ou com anomalias inerentes ao embrião.

Vanderwall (2008) considera que os factores que podem contribuir para a ocorrência de perda embrionária precoce se encontram divididos em factores intrínsecos, extrínsecos e embrionários. Os factores intrínsecos incluem patologia endometrial, níveis baixos de progesterona, idade da mãe, amamentação, uso do cio do poldro, nº de horas decorridas entre a IA e a ovulação, local de fixação intra-uterina da vesícula embrionária e anomalias nos cromossomas maternos. Entre os factores extrínsecos incluem-se o stress, a nutrição, a época do ano/clima, palpação rectal/ultrassonografia e a qualidade e processamento do sémen. Os factores embrionários incluem anomalias cromossómicas e outras características inerentes ao embrião e que aparentemente estão relacionados com os outros grupos de factores acima referidos.

Embora todos os factores apontados contribuam de forma negativa para o desenvolvimento saudável do embrião, torna-se fundamental abordar com mais pormenor a relação entre a idade da mãe e a TME precoce. É sabido que o ambiente uterino das éguas idosas não é favorável à manutenção de uma gestação. Isto porque, como já foi referido, estas éguas apresentam um maior ou menor grau de endometrose e muitas delas apresentam ainda endometrite recorrente (Vanderwall, 2008). Além deste factor, Ball *et al.* (1989) sugerem que os efeitos adversos do ambiente oviductal da mãe e/ou os defeitos inerentes ao embrião são os responsáveis pela baixa taxa de sobrevivência embrionária.

A deterioração dos oócitos associada ao aumento da idade materna está descrita noutras espécies, no entanto, são poucos os estudos em equinos desenvolvidos nesta área. A análise da maturação *in vitro* de oócitos de éguas jovens e idosas demonstrou que a maturação, para metafase II, dos oócitos de éguas idosas ocorre mais tardiamente, quando comparada aos oócitos de éguas jovens (Carnevale, Coutinho da Silva, Panzani, Stokes & Squires, 2005). Noutro estudo, Carnevale e Ginther (1995), colheram oócitos do oviducto de éguas jovens e idosas e transferiram-nos para os oviductos de éguas receptoras jovens, tendo as TG sido significativamente menores nos oócitos provenientes de éguas idosas e evidenciando o declínio da qualidade do oócito com o avançar da idade.

De modo a investigar melhor a qualidade do oócito, Carnevale, Griffin e Ginther (1993), utilizaram a microscopia óptica e a microscopia electrónica de transmissão para comparar

diferenças quantitativas e qualitativas em oócitos de éguas jovens e idosas. Quando sob o microscópio óptico, os autores verificaram que os oócitos de éguas idosas continham um número maior de vesículas intracelulares. Além disso, alguns oócitos de éguas idosas apresentavam anomalias morfológicas, não detectadas nos oócitos de éguas jovens, incluindo grandes vesículas no plasma ou anomalias associadas ao núcleo, formas irregulares ou alongadas, áreas de citoplasma sem organelos e secções de membrana plasmática com poucas microvilosidades. Mais recentemente, Rambags *et al.* (2005) identificaram que após a maturação *in vitro*, o nº de mitocôndrias era significativamente menor nos oócitos de éguas idosas. A microscopia electrónica de transmissão demonstrou que as mitocôndrias nos oócitos das éguas idosas apareciam muitas vezes tumefactas e com danificação extensa das cristas.

A ovulação tardia e o envelhecimento pré-ovulatório dos oócitos tem sido proposto como um factor associado a oócitos anormais em éguas idosas. Estas parecem sofrer senescência reprodutiva, caracterizada por fases foliculares mais prolongadas, ovulações irregulares e eventualmente inactividade folicular, o que parece ocorrer mais frequentemente em éguas com mais de 20 anos. O prolongamento da fase folicular parece estar associado a um aumento na concentração de FSH e LH, que ocorre em éguas idosas (Ball, 2000).

Estudos (Brinsko *et al.*, 1995) sugerem que a iniciação da transcrição embrionária, que se inicia no estadio 4 – 8 células, durante a embriogénese pode ser um factor associado com a mortalidade embrionária (ME) em éguas idosas. A avaliação do desenvolvimento *in vitro* de embriões de éguas idosas e jovens demonstrou que embora não haja alterações no desenvolvimento embrionário nos embriões de éguas idosas, estes embriões eram constituídos por blastómeros menores e de menor qualidade do que os embriões de éguas jovens, revelando uma menor qualidade dos embriões provenientes de éguas idosas (Brinsko *et al.*, 1994).

O diagnóstico das alterações que envolvem o oviducto, bem como as alterações que envolvem as fímbrias e os ovários, embora de diagnóstico bastante difícil deve ser considerado no diagnóstico de infertilidade/subfertilidade em algumas éguas, nas quais a ineficiência reprodutiva parece ocorrer sem explicação. São várias as alterações que podem ocorrer no oviducto, entre as quais a salpingite, as massas oviductais e as oclusões parecem ser as mais frequentemente diagnosticadas. A salpingite nas éguas não resulta em alargamento físico do oviducto, como acontece em outras espécies domésticas, uma vez que a camada muscular presente nos oviductos das éguas impede a distensão dos mesmos. Bennett (2007) refere a existência de massas oviductais e oclusões do lúmen, formadas por material colagénico, registando-se com maior incidência em éguas idosas. O mesmo autor também refere a retenção frequente de oócitos em vários estadios de degenerescência dentro do oviducto das éguas, não se sabendo se estes e as massas

oviductais se encontram relacionados ou se são duas entidades distintas. Devido à existência de um esfíncter oviductal torna-se difícil a passagem das massas colagénicas para o corno uterino, levando à oclusão do oviducto ou à interferência no normal funcionamento do mesmo. Qualquer alteração no ambiente oviductal terá influência no transporte dos espermatozóides (SPZ), na viabilidade do ócito, na fertilização e no transporte do embrião até ao útero, influenciando negativamente o sucesso reprodutivo nas éguas. Também poderão ocorrer alterações a nível das fímbrias, tais como quistos e aderências, e a nível dos ovários, tais como tumores, hematomas, adesões, fibrose e ovarites, que poderão comprometer a interacção ovário-fímbrias comprometendo a capacidade das mesmas de receber os óocitos que serão transportados para o oviducto e fertilizados (Bennett, 2007).

3. ASPECTOS A MELHORAR NO MANEIO REPRODUTIVO DA ÉGUA DADORA IDOSA

Em primeiro lugar é fundamental referir que todas as éguas em reprodução devem receber o manejo adequado, de modo a assegurar uma alimentação adequada, e consequentemente a condição corporal ideal. O manejo sanitário, tal como vacinação, desparasitação, profilaxia dentária, entre outros procedimentos não devem ser descurados. É ainda importante evitar situações de stress nestes animais, como introdução de animais novos, competição pelo alimento e temperaturas muito elevadas (Vanderwall, 2008).

De modo a aumentar a eficiência de um programa de TE com éguas idosas, Cadario (2006) refere que se deve ter em conta que o avançar da idade conduz a alterações a nível do eixo hipotálamo-hipofisário e a nível do tracto reprodutivo que incluem:

- Início da temporada reprodutiva (ciclicidade ovária) mais tardiamente, devendo ser implementados tratamentos de luz ou hormonais de modo a antecipar a época reprodutiva;
- Fases foliculares mais prolongadas, originando menos ciclos éstricos durante a época reprodutiva, pelo que se deverá encurtar a fase lútea e induzir a ovulação assim que se detectem folículos ≥ 35 mm;
- Maior incidência de folículos anovulatórios e uma resposta menos eficiente aos tratamentos indutores de ovulação e mais alterações morfológicas dos óocitos;
- Aumento da susceptibilidade à endometrite e diminuição da drenagem linfática uterina.

Deste modo, após o exame reprodutivo detalhado no início da época reprodutiva, que deve ser feito de forma asséptica e que deve incluir exame do cérvix, citologia e biópsia uterinas, deve ser formulado um plano individual de manejo para cada égua, de forma a compensar as anomalias detectadas. O objectivo é limitar a exposição ao sémen e às bactérias, e

auxiliar o útero a eliminar os contaminantes e produtos inflamatórios, após o serviço (LeBlanc, 2008).

É então importante atender aos seguintes passos de forma a minimizar a contaminação uterina:

Durante a carreira desportiva há um aumento bastante significativo da quantidade de massa muscular e perda de gordura corporal. Desta forma as éguas perdem também a gordura da zona perineal, deslocando o recto mais anteriormente e alterando a conformação perineal, permitindo a contaminação fecal repetida da vulva e vestibulo. Durante os períodos de exercício, a fadiga muscular e o estro contribuem para o relaxamento do períneo, sendo comum a aspiração de ar, de material fecal e de bactérias no vestibulo e vagina. Esta situação é ainda complicada pela administração frequente a estas éguas de *altrenogest* ou progesterona injectável, uma vez que a susceptibilidade à infecção aumenta quando o útero se encontra sob a influência da progesterona. A solução para esta situação passa por uma vulvoplastia, também conhecida como sutura de *Caslick*, de modo a proteger o tracto reprodutivo da pneumovagina e da contaminação fecal (Hurtgen, 2006). Se a conformação perineal for muito má e a sutura de *Caslick* for insuficiente para prevenir a pneumovagina é recomendada a realização de uma reconstrução perineal (cirurgia de *Pouret*) (Ricketts, 2008).

Após palpação/detecção por ecografia de um folículo pré-ovulatório, deve realizar-se o serviço (natural ou IA) o mais próximo possível da data prevista de ovulação (usar hCG ou agonista da GnRH para induzir ovulação), de forma a diminuir o nº de serviços/ciclo, uma vez que por si só a exposição ao sémen causa uma reacção inflamatória. O serviço deve ser feito com todos os cuidados de higiene possíveis (lavagem da vagina e zona perineal, aplicação de uma ligadura à volta da cauda da égua, lavagem do pénis do garanhão) e no caso de se efectuar IA poderá ser usado um diluidor que contenha antibióticos, ou no caso de monta natural, injectar no útero 100 ml de diluidor antes da monta (Ricketts, 2008).

Após o serviço, o *clearance* uterino pode ser auxiliado pela administração de ocitocina ou pela realização de uma lavagem uterina 6 a 8 horas após o serviço. 4 a 8 horas após o serviço o tratamento com ocitocina ou PGF2 α , auxilia o *clearance* uterino resultando no aumento da TG em éguas susceptíveis à endometrite pós-serviço. Ricketts (2008) sugere que o uso de baixas doses de ocitocina (5–10 UI) podem ser mais eficientes que doses elevadas na promoção do *clearance* uterino. Para além disto deve ter-se em atenção em que altura é administrada a PGF2 α , uma vez que esta, administrada 2 dias PO, pode causar atrasos na formação do CL, com potencial falha de gestação. Em situações em que haja deficiente dilatação cervical, pode ser realizada dilatação manual de modo a aumentar o *clearance* uterino. Em éguas com endometrite recorrente podem realizar-se tratamentos com antibióticos sistémicos e deve ser testada a hipótese de endometrite fúngica. Nos casos

em que se recolhem embriões de éguas com endometrite, os mesmos deverão ser lavados bastantes vezes (8 – 10) de modo a minimizar a possibilidade de infecção bacteriana ou fúngica para a égua receptora (Hurtgen, 2006).

IV. TRABALHO EXPERIMENTAL

O sucesso de um programa de TE depende do sucesso cumulativo de diversas etapas entre elas a ovulação, a recolha embrionária e a gestação após transferência. A égua dadora idosa desempenha um papel crucial no sucesso de programas de TE uma vez que embora a TO seja mais elevada, devido a uma maior incidência de OM, a TRE e a TG após transferência são menores quando comparadas com éguas jovens. Este aspecto deve-se, entre outros, à ocorrência de defeitos morfológicos dos oócitos e a uma maior susceptibilidade à endometrite.

Este trabalho consistiu na análise de dados de um centro de produção de embriões de grande escala localizado na Argentina, ao longo de 3 épocas reprodutivas, nomeadamente 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008. O objectivo foi determinar quais as variáveis que influenciaram a TO, a taxa de embriões recolhidos (TER), a eficiência da recolha (ER), a TG e a TME.

1. Materiais e métodos

1.1. Animais e manejo

225 éguas dadoras de embriões, de raça Pólo Argentino, com idades compreendidas entre os 3 e os 29 anos, divididas em duas categorias: jovens (≤ 13 anos) e idosas (≥ 14 anos), foram monitorizadas ao longo de 3 épocas reprodutivas (2005 a 2008).

As éguas dadoras foram avaliadas por palpação rectal e ecografia transrectal e inseminadas com uma dose de sémen fresco com, no mínimo, 500×10^6 SPZ com movimento progressivo rectilíneo (MPR) de 25 garanhões de fertilidade comprovada, quando ao exame ecográfico foi detectado um folículo ≥ 35 mm e edema uterino. Nos casos em que não ocorreu ovulação nas 48 horas seguintes à 1ª IA, as éguas voltaram a ser inseminadas a cada 48 horas, até detecção da ovulação. Em vários casos foram aplicados tratamentos de indução de ovulação, nomeadamente deslorelina (1,0 mg IM – BET LADes®, USA) ou hCG (1500 UI EV - Ovusyn®, Syntex SA, Argentina), tendo os mesmos sido administrados quando as dadoras apresentaram ao exame ecográfico um folículo com, no mínimo, 35 mm e edema uterino.

No dia após a IA as éguas dadoras foram avaliadas ecograficamente e, em caso de presença de líquido no lúmen uterino, tratadas para a endometrite (ocitocina e/ou lavagem endometrial). O dia 0 do ciclo foi considerado como o 1º dia em que por avaliação ecográfica e palpação transrectal a ovulação foi detectada. Os FHA foram incluídos no nº de ovulações registadas.

As lavagens uterinas para recolha de embriões foram realizadas sempre pelo mesmo operador, pelo que esta variável não influenciou qualquer parâmetro reprodutivo, entre o dia 7,5 - 8,5 PO e os embriões foram transferidos transcervicalmente para as éguas receptoras,

previamente seleccionadas por biópsia uterina (grau I ou IIA segundo a classificação de Kenney, 1978). Após cada lavagem era administrada PGF2 α às éguas dadoras, de forma a que as mesmas retornassem ao estro. O diagnóstico de gestação nas receptoras foi realizado aos 15, 30 e 45 dias de gestação.

1.2. Análise de dados

Os parâmetros reprodutivos avaliados em estudo encontram-se identificados e definidos na tabela 6 e as variáveis utilizadas na análise encontram-se identificadas na tabela 7.

Foi realizada uma base de dados em Microsoft Excel® que foi importada para o programa Statistica® for Windows, Version 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA, 1995). Os dados foram analisados por GLM (modelos lineares gerais) / MANOVA (análise multivariada de variância). Após identificação das variáveis significativas dentro do modelo, utilizou-se o método *post-hoc* das menores diferenças significativas (LSD) para a sua ulterior análise, tendo sido utilizado o limiar de $p < 0,05$ para estabelecer as diferenças significativas.

Não pôde ser estabelecido um modelo global com todas as interacções visto que algumas variáveis (égua dadora, garanhão, nº de ciclo éstrico, idade da égua dadora) não apresentavam todas as combinações possíveis. Como tal, avaliou-se individualmente cada uma das variáveis acima enunciadas, tendo-se estabelecido interacções apenas entre as restantes variáveis.

As variáveis categóricas (TG e TME), quando assinaladas, foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado (teste exacto de Fisher), em tabelas de contingência 2 x 2.

Tabela 6: Parâmetros reprodutivos avaliados

Taxa de ovulação	Nº médio de ovulações/ciclo/égua
Taxa de embriões recolhidos	Nº médio de embriões recolhidos/ciclo/égua
Eficiência da recolha (%)	Média do nº de embriões recolhidos/nº de ovulações
Taxa de gestação aos 15, 30 e 45 dias (%)	Média do nº de gestações aos 15, 30 ou 45 dias/ nº de embriões transferidos
Taxa de mortalidade embrionária entre [TE – 15 dias de gestação], [15 – 30 dias de gestação] e [30 – 45 dias de gestação] (%)	Média do nº de perdas de gestação aos 15, 30 ou 45 dias /nº de embriões transferidos ou gestação aos 15 ou 30 dias, respectivamente

Tabela 7: Variáveis analisadas com putativo efeito nos parâmetros reprodutivos

Época reprodutiva	1 (2005 – 2006) 2 (2006 – 2007) 3 (2007 – 2008)
Égua dadora (nº)	1 – 225
Idade da égua dadora (anos)	3 – 29
Categoria da égua dadora	Idosa (≥ 14 anos) Jovem (3 – 13 anos)
Garanhão (nº)	1 – 25
Ciclo éstrico (nº)	1 – 14
Tratamento indutor da ovulação	Nenhum hCG Deslorelina
Diâmetro do folículo dominante na altura da 1ª inseminação artificial (mm)	30 mm – 70 mm
Nº de inseminações artificiais / ciclo	1 – 4
Nº ovulações / ciclo	1 – 4
Lateralidade das ovulações	Unilateral Bilateral Simples
Sincronia das ovulações	Síncrona Assíncrona Simples
Endometrite pós inseminação artificial	Presente (Sim) Ausente (Não)
Nº de embriões recolhidos	0 – 3

2. Resultados

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 8. A análise incidiu sobre 2051 recolhas de embriões (TO, TER, ER) e 1485 TE (TG e TME).

Tabela 8: Visualização global dos resultados obtidos

<div> <div>Parâmetros</div> <div>reprodutivos</div> <div>Variáveis</div> </div>	Taxa Ovulação	Taxa Embr. Recolhidos	Eficiência Recolha	Taxa Gest. 15dias	Taxa Gest. 30dias	Taxa Gest. 45dias	Mortal. Emb. [transf – 15d]	Mortal. Emb. [15 – 30d]	Mortal. Emb. [30 – 45d]
Época	gl =2 p <0,05	NS	NS	gl =2(*) p <0,1	gl =2(*) p <0,1	NS(*)	gl =2(*) p <0,05	gl =2(*) p <0,1	NS (*)
Égua	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05	gl =224 p <0,05
Idade	gl= 26 p <0,05	na	Na	na	na	Na	na	na	Na
Categoria	gl =1 p <0,05	gl =1 p <0,05	gl =1 p <0,05	gl =1(*) p <0,1	gl =1(*) p <0,05	gl =1(*) p <0,05	gl =1(*) p <0,05	gl =1(*) p <0,1	NS (*)
Garanhão	gl =24 p <0,05	gl =24 p <0,05	gl =24 p <0,05	na	na	Na	na	na	Na
Nº ciclo éstrico	gl =13 p <0,05	gl =13 p <0,05	gl =13 p <0,05	na	na	Na	na	na	Na
Trat. indutor ovulação	gl =2 p <0,05	NS	gl =2 p <0,05	na	na	Na	na	na	Na
Tamanho folículo maior	gl =13 p <0,05	na	na	na	na	Na	na	na	Na
Nº Insem./ciclo	na	gl =4 p <0,05	gl =4 p <0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nº ovulações	na	na	gl =3 p <0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lateral. Ovulações	na	gl =2 p < 0,05	gl =2 p < 0,05	na	na	Na	na	na	Na
Sincronia ovulações	na	gl =2 p <0,05	gl =2 p <0,05	na	na	Na	na	na	Na
Endomet. pós inseminação	NS	gl =1 p <0,05	gl =1 p <0,05	NS (*)	NS (*)	NS (*)	NS (*)	gl =1(*) p <0,05	NS (*)
Nº embr. Recolhidos	na	na	gl =2 p <0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

na – não analisado; gl – graus de liberdade; p – nível de significância; NS – não significativo ($p > 0,05$); (*) – variáveis analisadas pelo teste de qui – quadrado (χ^2)

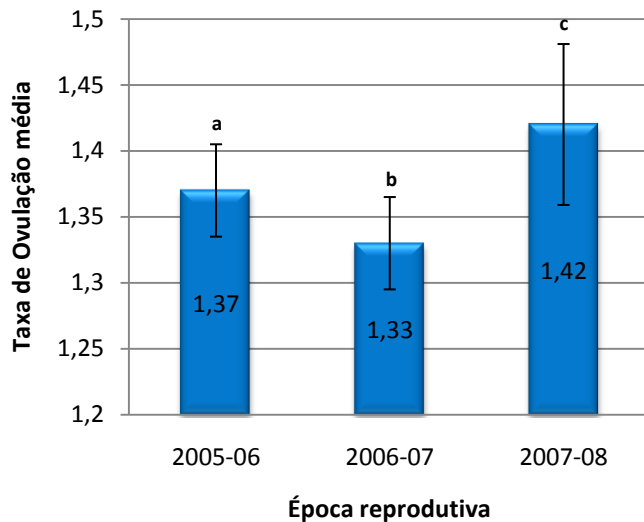
2.1. Variáveis com influência na taxa de ovulação

Conforme observado na tabela 8, as variáveis que influenciaram ($p < 0,05$) a TO foram: época reprodutiva, égua dadora, sua idade e categoria, garanhão, nº do ciclo éstrico, diâmetro do folículo dominante e tratamento indutor de ovulação. Em seguida apresentam-se os gráficos referentes às variáveis com efeito estatisticamente significativo sobre a TO.

2.1.1. Época reprodutiva

A época reprodutiva influenciou ($p = 0,015$) a TO, tendo sido em média igual a 1,37 ovulações/ciclo/égua (gráfico 1).

Gráfico 1: Influência da época reprodutiva sobre a taxa de ovulação



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,068$; ac, $p = 0,15$; bc, $p = 0,006$

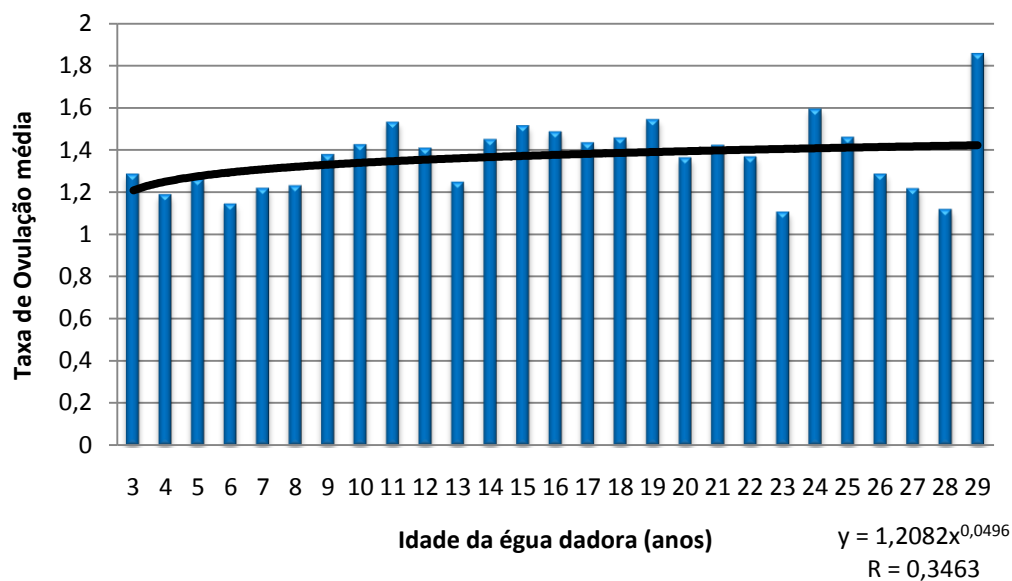
2.1.2. Égua dadora

A égua dadora influenciou muito significativamente ($p \approx 0$) a TO, resultando em TO médias que variaram entre 1 e 2,5 ovulações/ciclo/égua.

2.1.3. Idade da égua dadora

A idade da égua dadora também influenciou muito significativamente ($p \approx 0$) a TO. A TO média foi de 1,36, variando entre 1,11 (21 anos) e 1,85 (29 anos). Como se pode observar no gráfico 2 a TO tende a aumentar com o aumento da idade da égua.

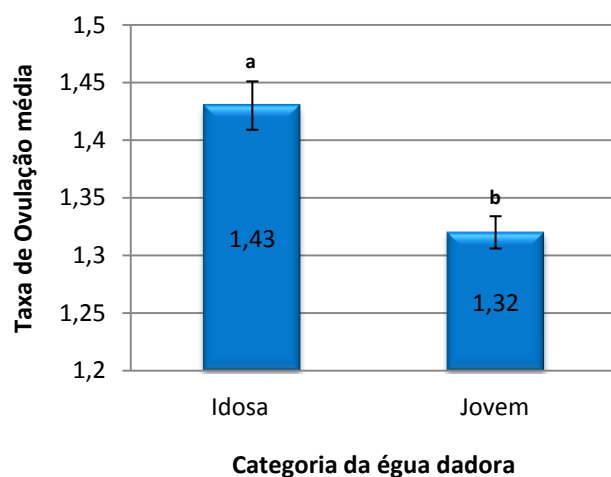
Gráfico 2: Influência da idade da égua dadora na taxa de ovulação



2.1.4. Categoria da égua dadora

A categoria da égua dadora representou uma variável muito significativa ($p \approx 0$) na TO, ocorrendo uma maior TO média em éguas idosas (1,43) do que em éguas jovens (1,32) (gráfico 3).

Gráfico 3: Influência da categoria da égua dadora na taxa de ovulação



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$

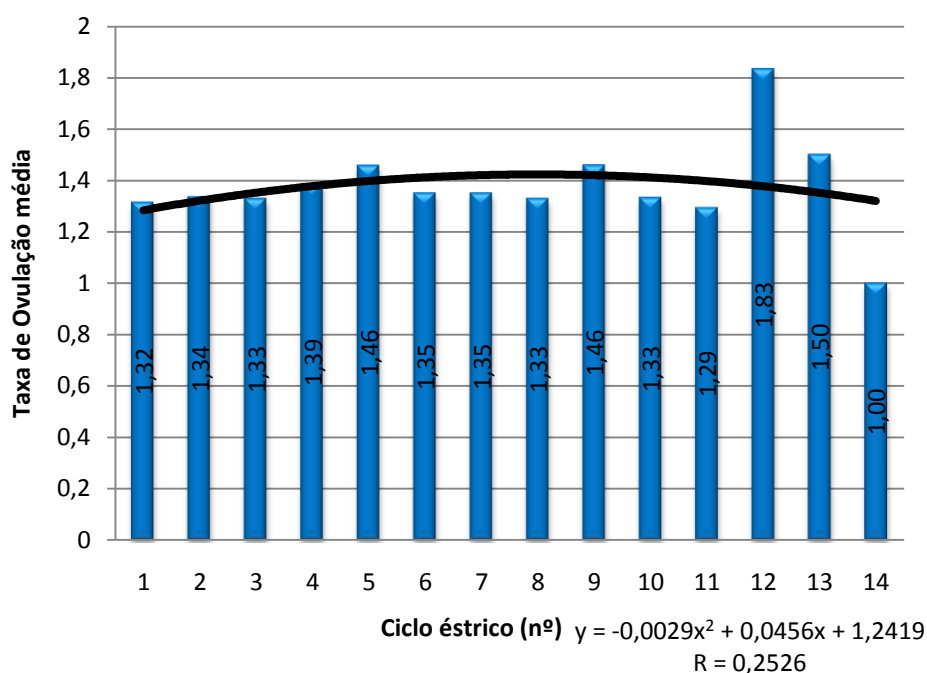
2.1.5. Garanhão

Foi observado um efeito significativo ($p = 0,049$) do garanhão sobre a TO.

2.1.6. Nº ciclo éstrico

A TO foi influenciada significativamente ($p \approx 0$) pelo nº de ciclo éstrico, aumentando do 1º (1,32) ao 5º ciclo (1,46) e tendendo a diminuir progressivamente após este último (gráfico 4). O nº de observações em cada ciclo começou a diminuir a partir do 4º ciclo e portanto, embora o 9º, o 12º e o 13º ciclos resultem em TO discrepantes da tendência, é necessário ter em consideração o reduzido nº de éguas que ainda se encontrava em estudo: $n = 50$, $n = 6$ e $n = 2$, respectivamente.

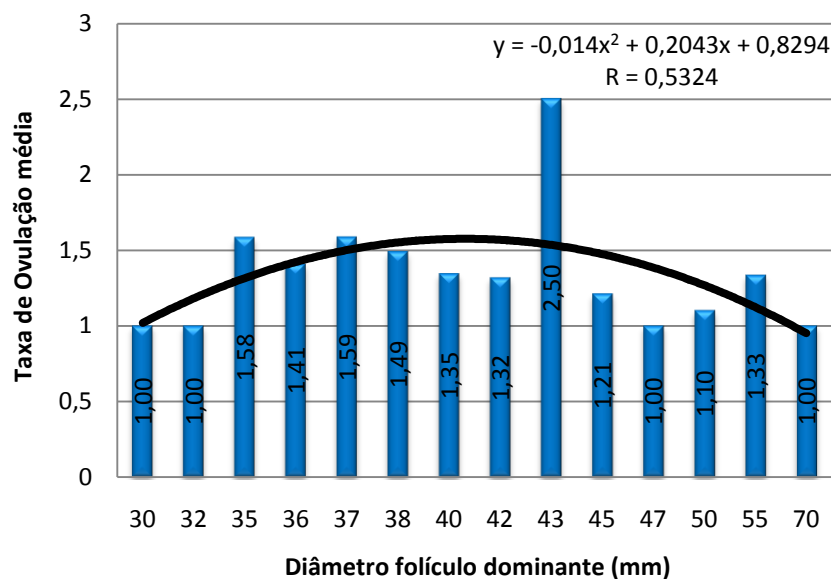
Gráfico 4: Influência do nº do ciclo éstrico na taxa de ovulação



2.1.7. Diâmetro do folículo dominante

O diâmetro do folículo dominante influenciou significativamente ($p \approx 0$) a TO (gráfico 5). Folículos com menos de 35 mm e com mais de 40 mm resultaram em TO mais baixas. O nº de observações começou a diminuir a partir de diâmetros ≥ 42 mm e portanto embora a média de ovulações seja bastante discrepante (2,5) em relação à média total, para folículos com 43 mm de diâmetro, o nº de casos em que se registou este diâmetro foi extremamente diminuto ($n = 2$). O mesmo se verifica para os resultados obtidos com folículos com 55 mm ($n = 3$).

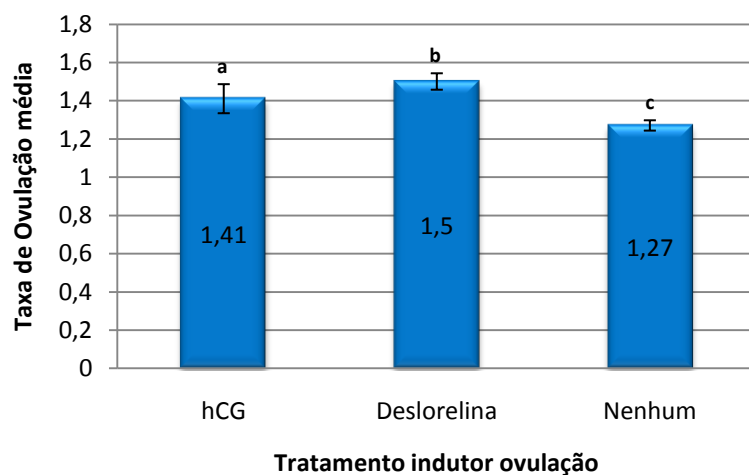
Gráfico 5: Influência do diâmetro do folículo dominante na taxa de ovulação



2.1.8. Tratamento indutor de ovulação

A utilização de tratamentos de indução da ovulação influenciou significativamente ($p \approx 0$) a TO (gráfico 6). A utilização de indutores de ovulação resultou em TO mais elevadas (média de 1,46 ovulações/ciclo/égua usando tratamento indutor *versus* 1,27 sem tratamento indutor). Entre eles, o uso da deslorelina pareceu ser o mais eficiente (média de 1,50 ovulações/ciclo/égua *versus* 1,41 obtidas com o uso da hCG).

Gráfico 6: Influência do tratamento indutor de ovulação na taxa de ovulação



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,037$; ac, $p = 0,000$; bc, $p = 0,000$

2.2. Variáveis com influência na taxa de embriões recolhidos

Conforme observado na tabela 3, as variáveis que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a TER foram: égua dadora, categoria da égua dadora, garanhão, nº do ciclo éstrico, nº de IA/ciclo, nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia e a presença de endometrite pós-IA. Em seguida, apresentam-se os gráficos referentes às variáveis com efeito estatisticamente significativo sobre o nº de embriões recolhidos.

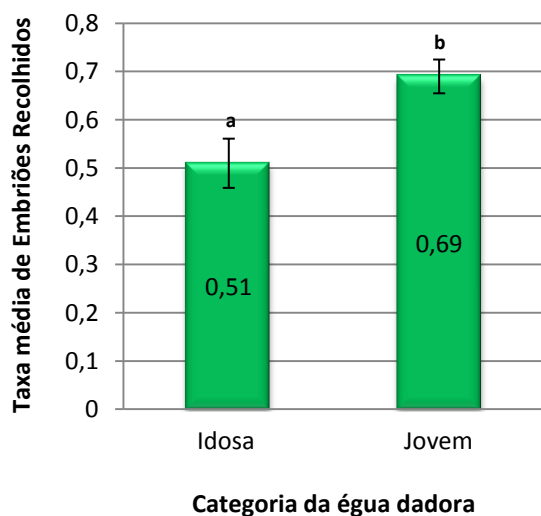
2.2.1. Égua dadora

A égua dadora influenciou muito significativamente ($p \approx 0$) a TER, a qual variou entre 0,00 e 2,00 embriões/ciclo/égua.

2.2.2. Categoria da égua dadora

A categoria da égua dadora também teve grande influência ($p \approx 0$) na TER. O número médio de embriões recolhidos por ciclo foi de 0,60, tendo sido obtidos mais embriões de éguas jovens (0,69 embriões/ciclo) do que de éguas idosas (0,51 embriões/ciclo) (gráfico 7).

Gráfico 7: Influência da categoria da égua dadora na taxa de embriões recolhidos



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$

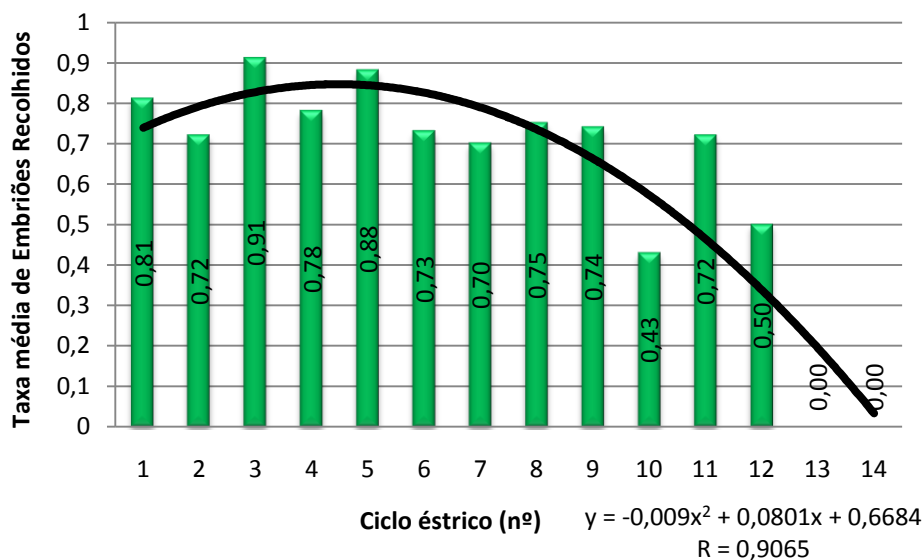
2.2.3. Garanhão

O garanhão foi também uma variável extremamente influente na TER ($p \approx 0$), tendo esta variado entre 0 e 1,33 embriões/ciclo.

2.2.4. Nº do ciclo éstrico

Como se pode observar pela análise do gráfico 8, a TER aumenta do 1º (0,81 embriões/ciclo) ao 5º ciclo (0,88 embriões/ciclo), começando depois a diminuir, até atingir o mínimo (0 embriões/ciclo) no 13º ciclo.

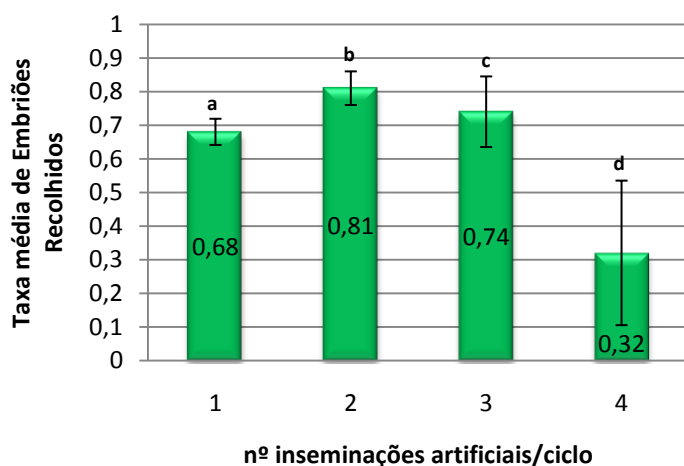
Gráfico 8: Influência do nº do ciclo éstrico na taxa de embriões recolhidos



2.2.5. Nº de inseminações artificiais / ciclo

O nº de IA/ciclo influenciou significativamente ($p \approx 0$) a TER. Esta aumentou quando foram realizadas até 2 IA/ciclo (0,81 embriões/ciclo), começando a diminuir a partir da 3ª IA e diminuindo abruptamente quando realizadas 4 IA/ciclo (0,74 embriões/ciclo com 3 IA e 0,32 embriões/ciclo com 4 IA) (gráfico 9).

Gráfico 9: Influência do nº de inseminações/ciclo na taxa de embriões recolhidos

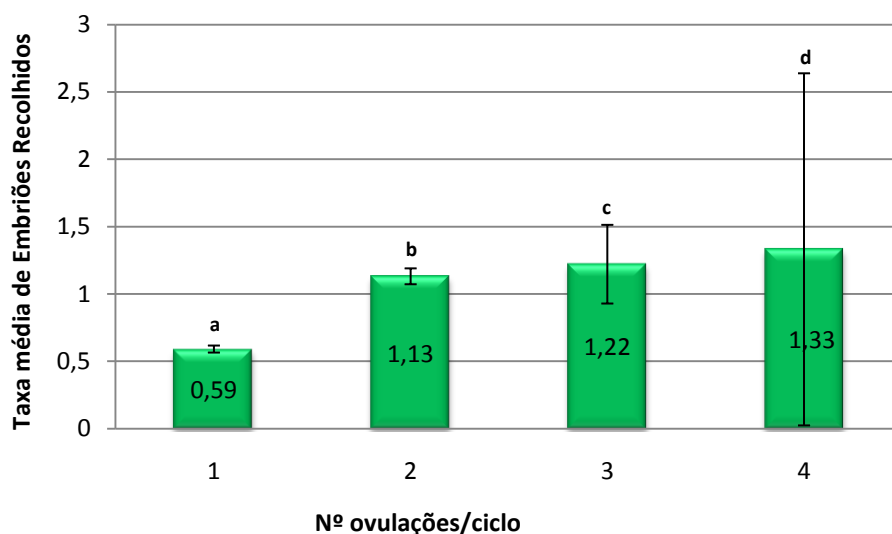


Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,279$; ad, $p = 0,015$; bc, $p = 0,209$; bd, $p = 0,000$; cd, $p = 0,007$

2.2.6. N° de ovulações, sua lateralidade e sincronia

As três variáveis em análise foram muito influentes ($p \approx 0$) na TER. A média de embriões recolhidos por ciclo foi de 0,59 quando ocorreram ovulações simples e de 1,23 quando ocorreram OM (1,13 em ovulações duplas, 1,22 em ovulações triplas e 1,33 em ovulações quádruplas) (gráfico 10). Dentro das OM as ovulações bilaterais (1,15 embriões/ciclo) e as ovulações síncronas (1,06 embriões/ciclo) resultaram em TER mais elevadas (gráficos 11 e 12).

Gráfico 10: Influência do n° de ovulações/ciclo na taxa de embriões recolhidos



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,000$; ad, $p = 0,343$; bc, $p = 0,807$; bd, $p = 0,775$; cd, $p = 0,957$

Gráficos 11 e 12: Influência da lateralidade e sincronia das ovulações na taxa de embriões recolhidos

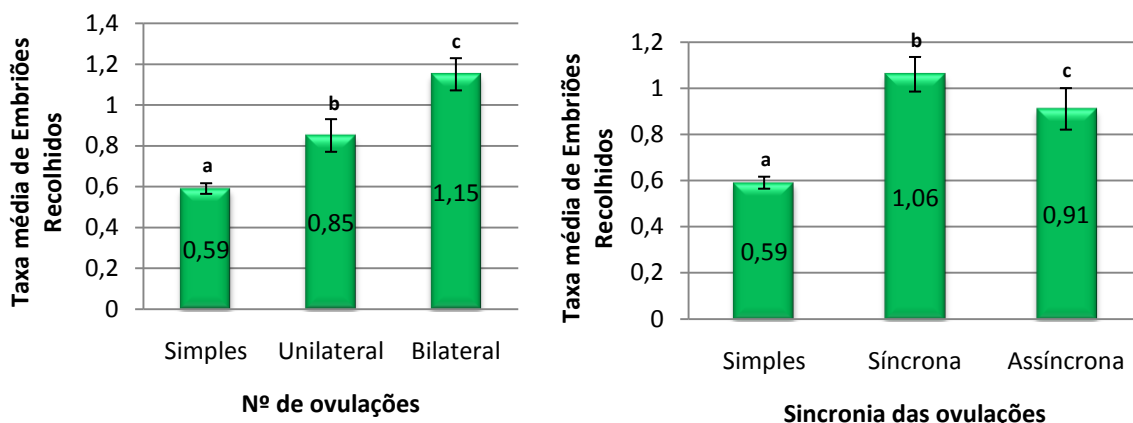


Gráfico 11: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; abc, $p = 0,000$

Gráfico 12: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,000$; bc, $p = 0,031$

2.2.7. Endometrite pós inseminação artificial

A TER foi muito influenciada ($p \approx 0$) pela presença de endometrite pós-IA, tendo sido menor em éguas com endometrite do que sem endometrite (0,47 versus 0,73 embriões/ciclo, respectivamente) (gráfico 13). O gráfico 14 ilustra a interação entre a presença de endometrite pós-IA e a categoria da égua dadora na TER. Da sua análise pode verificar-se que, éguas idosas com endometrite apresentaram a menor TER (0,37 embriões/ciclo) e éguas jovens sem endometrite a maior TER (0,81 embriões/ciclo).

Gráficos 13 e 14: Influência da presença de endometrite pós inseminação artificial na taxa de embriões recolhidos e interação entre a presença de endometrite pós inseminação artificial e a categoria da égua dadora na taxa de embriões recolhidos

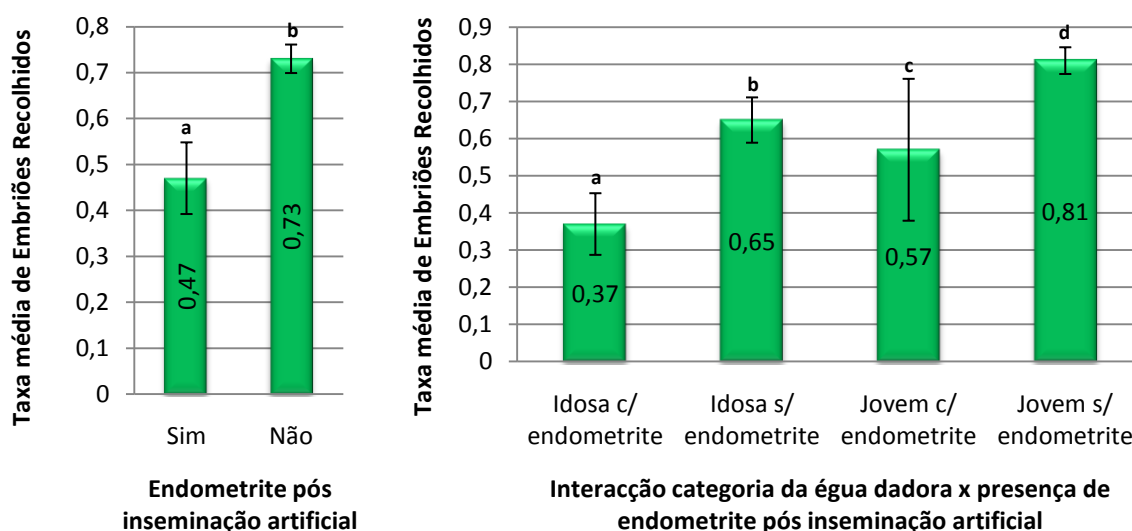


Gráfico 13: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p=0,000$

Gráfico 14: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p=0,000$; ac, $p=0,047$; ad, $p=0,000$; bc, $p=0,391$; bd, $p=0,000$; cd, $p=0,007$

2.3. Variáveis com influência na eficiência da recolha

Conforme observado na tabela 3, as variáveis que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a ER foram: égua dadora, categoria da égua dadora, garanhão, nº do ciclo éstrico, tratamento indutor de ovulação, nº de IA/ciclo, nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia, nº de embriões recolhidos e presença de endometrite pós-IA. Abaixo, apresentam-se os gráficos referentes às variáveis com efeito estatisticamente significativo sobre a ER.

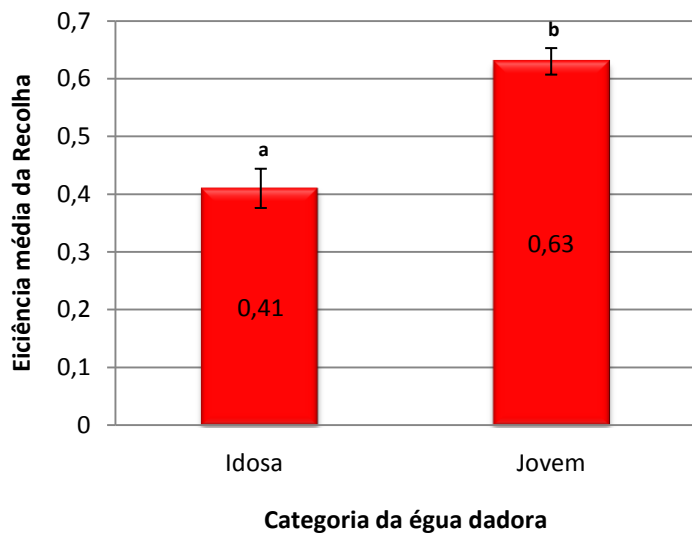
2.3.1. Égua dadora

A égua dadora foi uma variável com muita influência ($p \approx 0$) na ER, obtendo-se valores que variaram entre 0 e 100%.

2.3.2. Categoria da égua dadora

A ER foi também muito influenciada ($p \approx 0$) pela categoria da égua dadora, tendo-se obtido taxas mais elevadas nas éguas jovens (63%) do que nas éguas idosas (41%) (gráfico 15).

Gráfico 15: Influência da categoria da égua dadora na eficiência da recolha



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p=0,000$

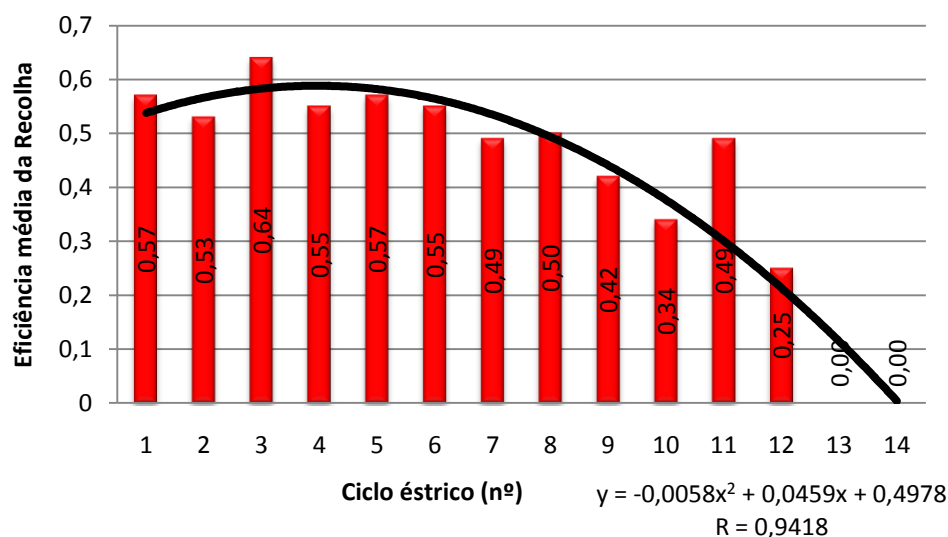
2.3.3. Garanhão

Tal como a égua dadora, o garanhão foi uma das variáveis com mais influência ($p \approx 0$) na ER, a qual variou entre 0% e 100%.

2.3.4. Nº do ciclo éstrico

O nº do ciclo também influenciou significativamente ($p = 0,002$) a ER. Deste modo, e seguindo a mesma tendência da TO, a ER aumentou do 1º (ER = 57%) ao 5º ciclo (ER = 57%), começando depois a diminuir progressivamente, atingindo o seu valor mínimo (ER = 0%) no 13º ciclo (gráfico 16).

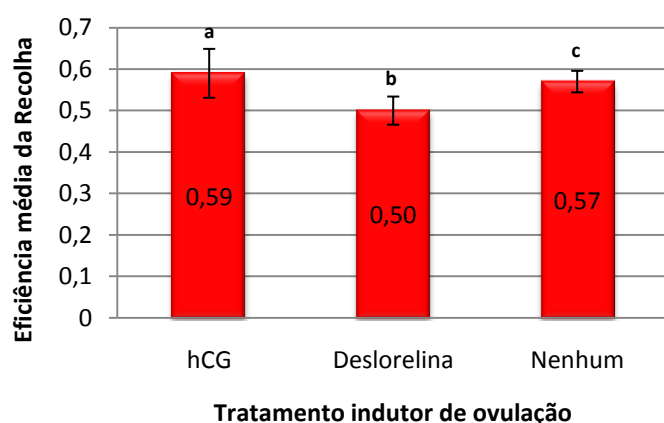
Gráfico 16: Influência do nº do ciclo éstrico na eficiência da recolha



2.3.5. Tratamento indutor de ovulação

Esta variável influenciou significativamente ($p = 0,005$) a ER. A indução da ovulação com hCG foi o tratamento que resultou em maior ER (59% *versus* 50% induzindo a ovulação com Deslorelina). Sem qualquer tratamento indutor de ovulação a ER foi de 57% (gráfico 17). Obteve-se 58% de ER, em OM induzidas com deslorelina, 56% em OM induzidas com hCG e 53% em OM não induzidas. A ER, em ovulações simples, foi de 51% pela indução com deslorelina, 64% com hCG e 61% sem indução de ovulação.

Gráfico 17: Influência do tratamento indutor de ovulação na eficiência da recolha

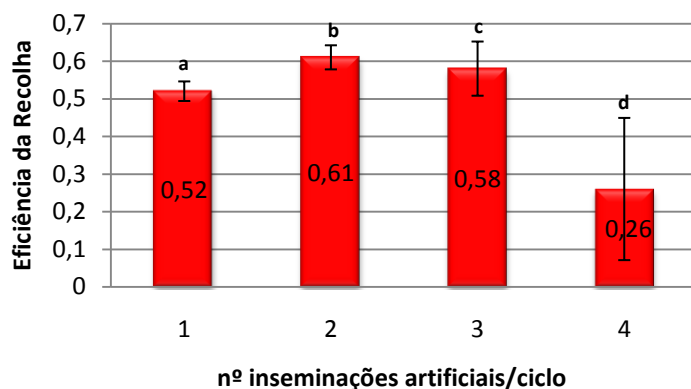


Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,026$; ac, $p = 0,718$; bc, $p = 0,002$

2.3.6. Nº de inseminações artificiais / ciclo

Tal como verificado para a TER, o nº de IA/ciclo influenciou significativamente ($p \approx 0$) e com a mesma tendência a ER, que aumentou até 2 IA/ciclo (61% de ER) e começou a partir daí a diminuir progressivamente (26% de ER quando realizadas 4 IA) (gráfico 18).

Gráfico 18: Influência do nº inseminações artificiais / ciclo na eficiência da recolha

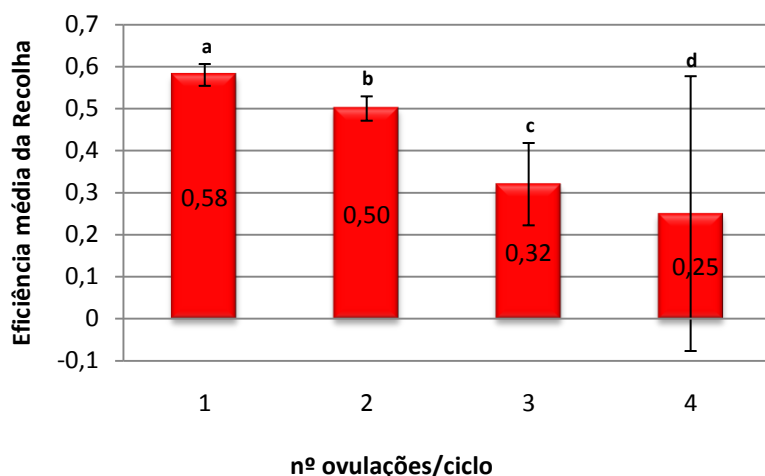


Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,124$; ad, $p = 0,017$; bc, $p = 0,471$; bd, $p = 0,001$; cd, $p = 0,005$

2.3.7. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia

O nº de ovulações influenciou significativa ($p \approx 0$) e negativamente a ER: as ovulações simples proporcionaram maior ER (58%), a qual diminuiu progressivamente conforme aumentaram o nº de ovulações (25% quando ocorreram 4 ovulações) (gráfico 19). Quando se registaram OM, as ovulações bilaterais foram as que apresentaram maior ER (56% *versus* 42% nas ovulações unilaterais) bem como as ovulações síncronas (52% *versus* 45% nas ovulações assíncronas) (gráficos 20 e 21).

Gráfico 19: Influência do nº ovulações/ciclo na eficiência da recolha



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,000$; ad, $p = 0,308$; bc, $p = 0,019$; bd, $p = 0,447$; cd, $p = 0,823$

Gráficos 20 e 21: Influência da lateralidade e sincronia das ovulações na eficiência da recolha

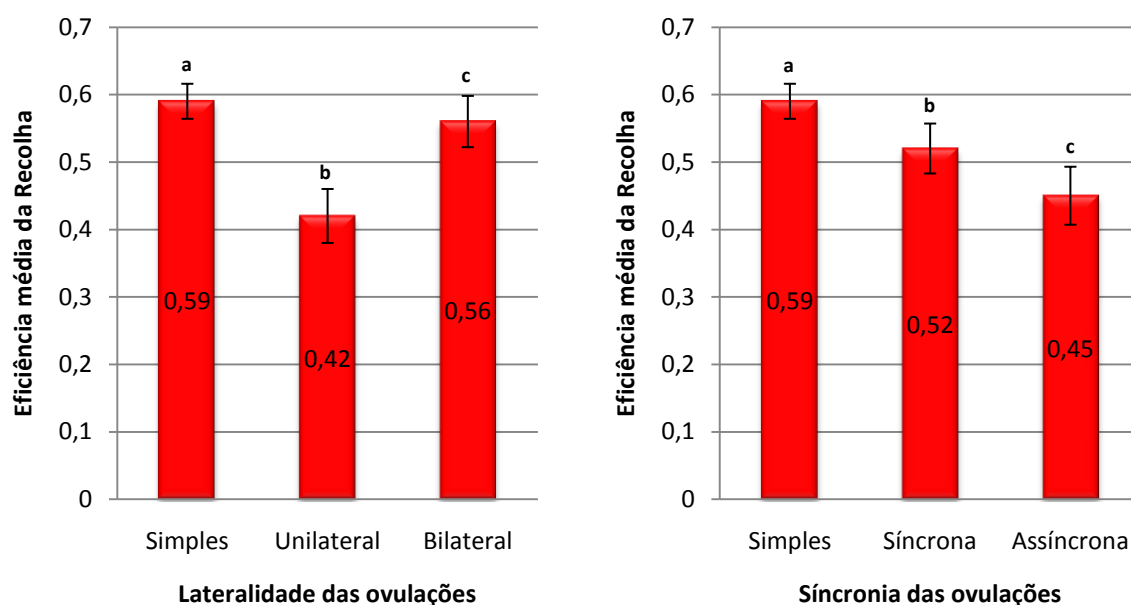


Gráfico 20: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,361$; bc, $p = 0,000$

Gráfico 21: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,012$; ac, $p = 0,000$; bc, $p = 0,047$

2.3.8. Endometrite pós inseminação artificial

Tal como verificado para a TER, a endometrite pós-IA influenciou significativa ($p \approx 0$) e negativamente a ER (59% em éguas sem endometrite e 31% em éguas com endometrite) (gráfico 22). A interação presença de endometrite pós-IA x categoria da égua dadora mostrou que as éguas idosas com endometrite apresentaram os valores mais baixos de ER (27%) e as éguas jovens sem endometrite os valores mais altos de ER (63%) (gráfico 23).

Gráficos 22 e 23: Influência da presença de endometrite pós inseminação artificial na eficiência da recolha e interação entre a presença de endometrite pós inseminação artificial e a categoria da égua dadora na eficiência da recolha

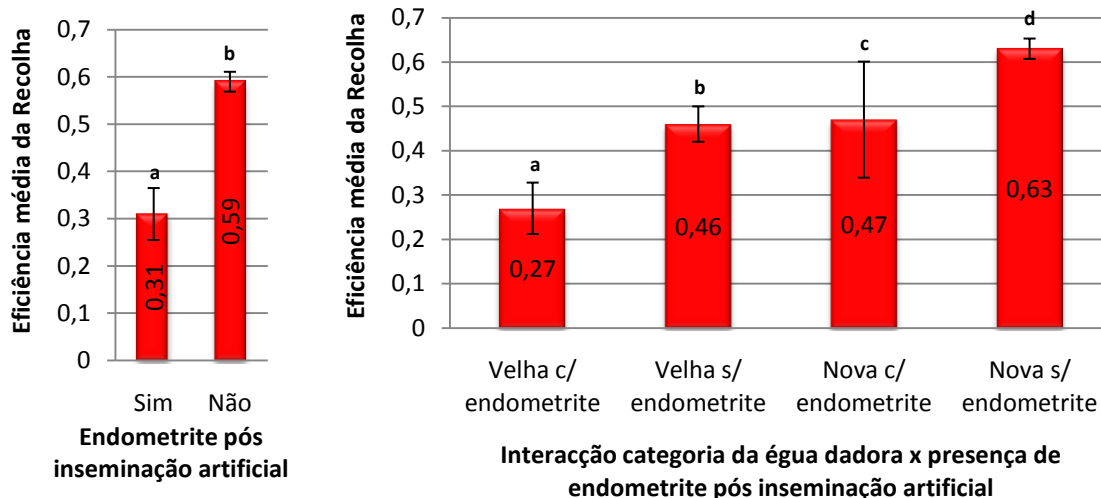


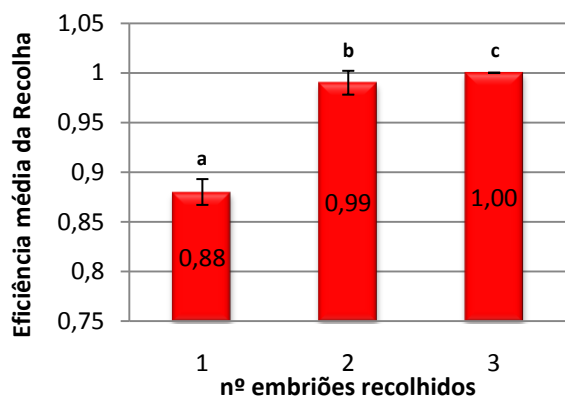
Gráfico 22: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$

Gráfico 23: Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,004$; ad, $p = 0,000$; bc, $p = 0,903$; bd, $p = 0,000$; cd, $p = 0,012$

2.3.9. Nº de embriões recolhidos

O nº de embriões influenciou significativa ($p \approx 0$) e positivamente a ER (gráfico 24).

Gráfico 24: Influência do nº de embriões recolhidos na eficiência da recolha



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$; ac, $p = 0,190$; bc, $p = 0,929$

2.4. Variáveis com influência na taxa de gestação

Conforme observado na tabela 8, a variável que influenciou significativamente ($p < 0,05$) a TG aos 15 dias foi a égua dadora e as variáveis que apresentaram tendência para a significância ($p < 0,1$) foram a época reprodutiva e a categoria da égua dadora. As variáveis que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a TG aos 30 dias foram a égua dadora e a

categoria da égua dadora e a que apresentou tendência para a significância ($p < 0,1$) foi a época reprodutiva. As variáveis que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a TG aos 45 dias foram a égua dadora e a categoria da égua dadora. Em seguida, apresenta-se a tabela com os resultados obtidos pela análise estatística com o teste de Qui-quadrado.

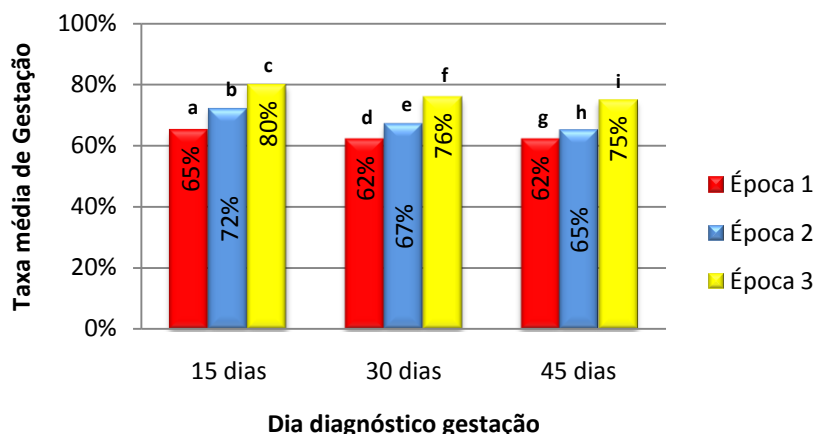
Tabela 9: Tabela descritiva da influência da época reprodutiva, categoria e presença de endometrite pós-inseminação na taxa de gestação e na taxa de mortalidade embrionária

Parâmetro reprodutivo Variável		Taxa de Gestação (% n/n)			Taxa de Mortalidade Embrionária (% n/n)		
		15 dias	30 dias	45 dias	[TE – 15d]	[15 – 30d]	[30 – 45d]
Época reprodutiva	2005-06	65% (423/651)	62% (405/651)	62% (401/651)	35% (228/651)	3% (18/423)	0% (4/405)
	2006-07	72% (454/630)	67% (421/630)	65% (412/630)	28% (176/630)	5% (33/630)	2% (9/630)
	2007-08	80% (163/204)	76% (156/204)	75% (153/204)	20% (41/204)	4% (7/204)	1% (3/630)
Categoria da égua dadora	Idosa	62% (247/396)	57% (224/396)	55% (218/396)	38% (149/396)	5% (23/247)	2% (6/224)
	Jovem	73% (793/1089)	70% (758/1089)	69% (748/1089)	27% (296/1089)	3% (35/793)	1% (10/758)
Endometrite pós insem. artificial	Presente	64% (65/102)	56% (57/102)	55% (56/102)	36% (37/102)	8% (8/102)	1% (1/102)
	Ausente	70% (975/1383)	67% (925/1383)	66% (910/1383)	30% (408/1383)	3% (50/875)	1% (15/925)

2.4.1. Época reprodutiva

A época reprodutiva teve tendência para a significância na TG aos 15 e aos 30 dias de gestação. O maior nível de significância ocorreu entre as épocas reprodutivas 1 e 3 (gráfico 25).

Gráfico 25: Influência da época reprodutiva na taxa de gestação



ab, $p = 0,238$; ac, $p = 0,090$; bc, $p = 0,396$; de, $p = 0,423$; df, $p = 0,095$; ef, $p = 0,275$; gh, $p = 0,505$; gi, $p = 0,113$; hi, $p = 0,270$

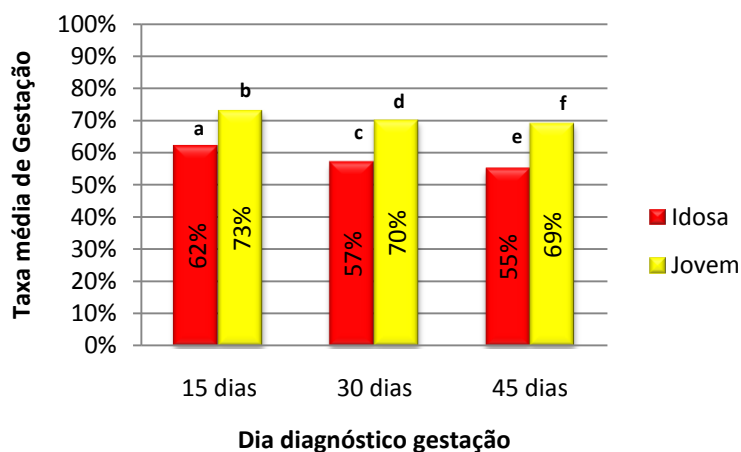
2.4.2. Égua dadora

Esta variável influenciou significativamente ($p \approx 0$) a TG. A TG aos 15, 30 e 45 dias variou entre 0 e 100%. A TG média foi de 71% aos 15, 67% aos 30 e 66% aos 45 dias.

2.4.3. Categoria da égua dadora

A categoria da égua dadora influenciou significativamente a TG aos 30 ($p = 0,031$) e aos 45 dias ($p = 0,022$) e teve uma tendência para a significância na TG aos 15 dias ($p = 0,098$) (gráfico 26).

Gráficos 26: Influência da categoria da égua dadora na taxa de gestação

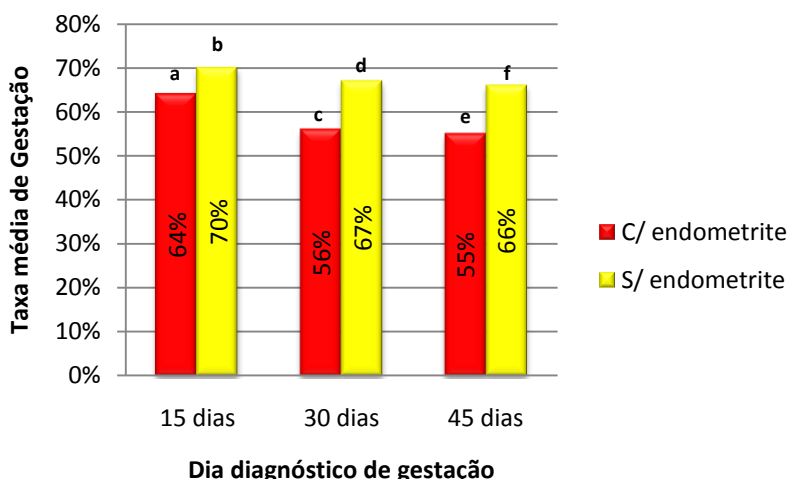


ab, $p = 0,098$; cd, $p = 0,031$; ef, $p = 0,022$

2.4.4. Endometrite pós inseminação artificial

Embora esta variável não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$), considero as diferenças na TG relevantes a nível prático. Em todos os diagnósticos de gestação (15, 30 e 45 dias), as éguas dadoras com endometrite pós-IA apresentaram TG inferiores às registadas em éguas dadoras sem endometrite pós-IA (gráfico 27).

Gráfico 27: Influência da presença de endometrite pós-inseminação na taxa de gestação



ab, $p = 0,538$; cd, $p = 0,292$; ef, $p = 0,291$

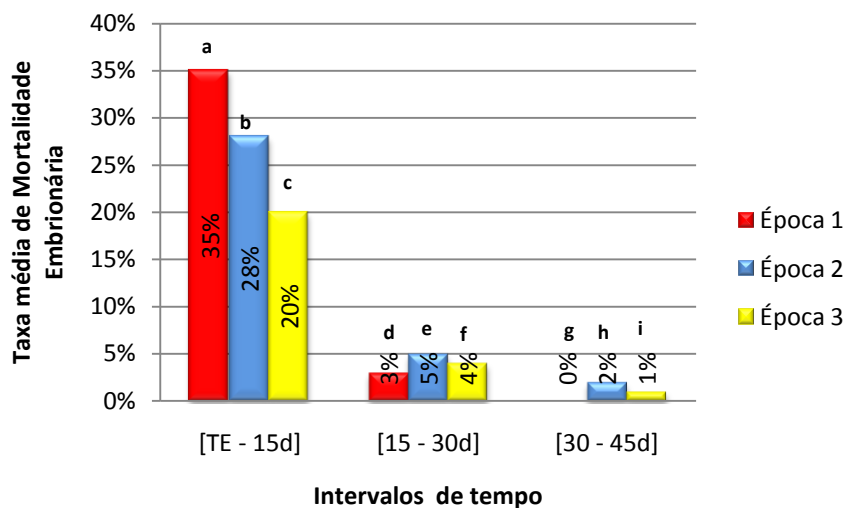
2.5. Variáveis com influência na taxa de mortalidade embrionária

Conforme observado na tabela 8, as variáveis que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a TME entre [TE – 15 dias] foram a égua dadora, a categoria da égua dadora e a época reprodutiva. As variáveis que influenciaram significativamente a TME entre [15 - 30 dias] foram a égua dadora e a presença de endometrite pós-IA e as variáveis com tendência para a significância foram a época reprodutiva e a categoria da égua dadora. A única variável que influenciou significativamente a TME entre os [30 - 45 dias] foi a égua dadora.

2.5.1. Época reprodutiva

A época reprodutiva influenciou significativamente a TME [TE – 15 dias] entre as épocas 1 e 2 ($p = 0,049$) e entre as épocas 1 e 3 ($p = 0,003$), verificando-se também uma tendência para a significância entre as épocas 2 e 3 ($p = 0,084$). Na TME [15 – 30 dias] verificou-se uma tendência para a significância entre as épocas 1 e 2 ($p = 0,072$) (gráfico 28).

Gráfico 28: Influência da época reprodutiva na taxa de mortalidade embrionária



ab, $p = 0,049$; ac, $p = 0,003$; bc, $p = 0,084$; de, $p = 0,072$; df, $p = 0,984$; ef, $p = 0,212$; gh, $p = 0,986$; gi, $p = 0,378$; hi, $p = 0,875$

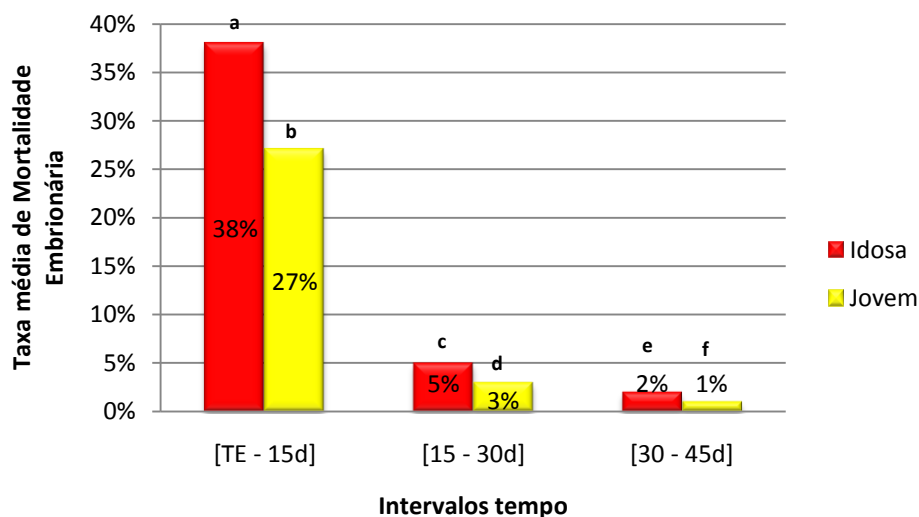
2.5.2. Égua dadora

A égua dadora influenciou significativamente a TME, que variou entre 0% e 100%.

2.5.3. Categoria da égua dadora

A categoria da égua dadora influenciou significativamente ($p = 0,005$) a TME [TE – 15 dias] e teve uma tendência para a significância ($p = 0,062$) na TME [15 – 30 dias] (gráfico 29).

Gráfico 29: Influência da categoria da égua dadora na taxa de mortalidade embrionária

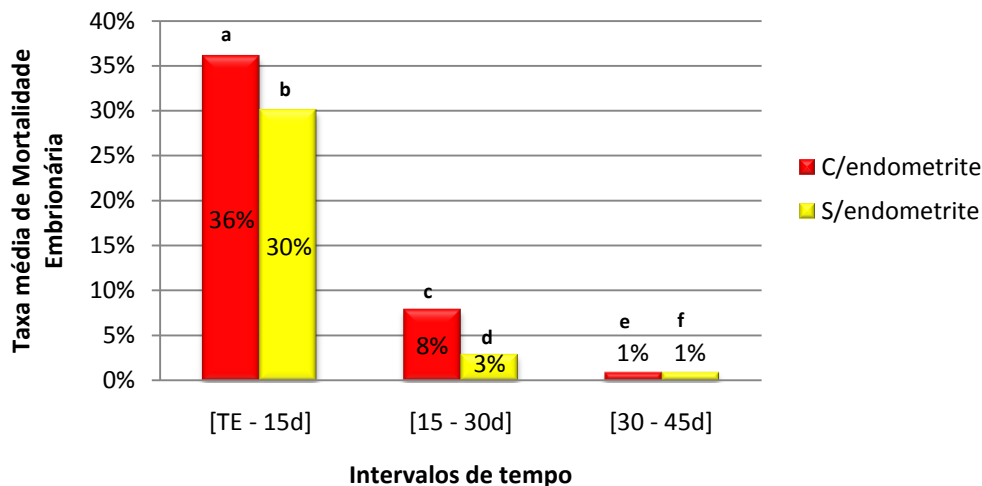


ab, $p = 0,005$; cd, $p = 0,062$; ef, $p = 0,166$

2.5.4. Endometrite pós inseminação artificial

A presença de endometrite pós-IA influenciou significativamente ($p = 0,025$) a TME [15 – 30 dias] (gráfico 30).

Gráfico 30: Influência da presença de endometrite pós-inseminação na taxa de mortalidade embrionária



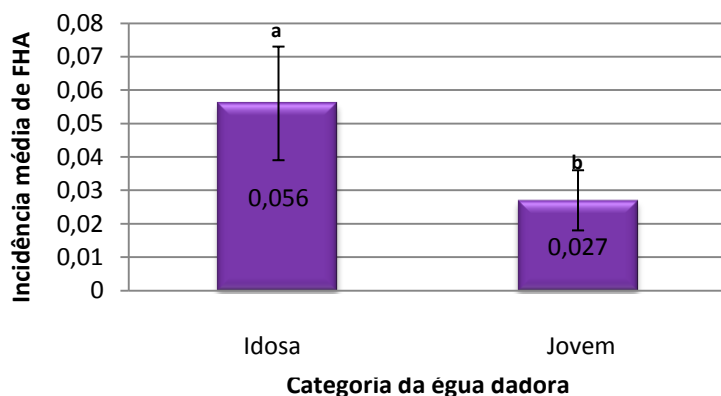
ab, $p = 0,301$; cd, $p = 0,025$; ef, $p = 0,940$

2.6. Outras variáveis com efeito significativo na eficiência de programas de transferência de embriões

2.6.1. Incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios

A categoria da égua dadora influenciou significativamente ($p = 0,001$) a incidência de FHA, tendo-se registrando mais frequentemente em éguas idosas (5,6% contra 2,7% em éguas jovens) (gráfico 31).

Gráfico 31: Influência da categoria da égua dadora na incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios (FHA)

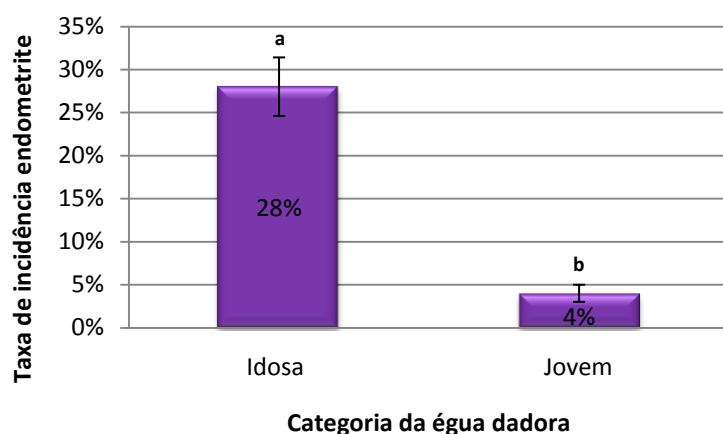


Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,001$

2.6.2. Incidência de endometrite pós inseminação artificial

A categoria da égua dadora influenciou significativamente ($p \approx 0$) a incidência de endometrite pós-IA. A incidência média de endometrite pós-IA foi de 12%. As éguas idosas foram mais susceptíveis a esta patologia do que as éguas jovens (incidência de 28 e 4%, respectivamente).

Gráfico 32: Influência da categoria da égua dadora na incidência de endometrite pós inseminação artificial

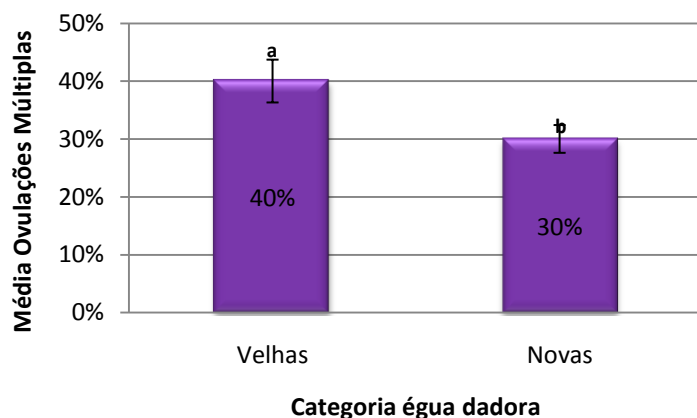


Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$

2.6.3. Incidência de ovulações múltiplas

A categoria da égua dadora influenciou significativamente ($p \approx 0$) a incidência de OM. As éguas idosas apresentaram com mais frequência OM do que as éguas jovens (40% nas éguas idosas e 30% nas éguas jovens) (gráfico 33).

Gráfico 33: Influência da categoria da égua dadora na incidência de ovulações múltiplas



Barras indicam o intervalo de confiança 95%; ab, $p = 0,000$

3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1. Égua dadora

A égua dadora foi uma variável com influência significativa em todos os parâmetros analisados. Imensos factores intervêm para a individualidade de cada égua e que a tornam única. Embora o manejo tenha sido o mesmo para todas as dadoras neste programa, ainda persistem muitas diferenças que poderão interferir nos parâmetros reprodutivos de cada uma. Alguns destes factores são: idade, condição corporal, existência de patologia do foro reprodutivo, ou outro de foro que, embora não afecte directamente o sistema reprodutivo, tem influência indirecta sobre o mesmo, e ainda susceptibilidade ao stress, genética, entre outros.

3.2. Variáveis com influência na taxa de ovulação

3.2.1. Época reprodutiva

A TO foi influenciada pela época reprodutiva. Tal pode ter-se devido às diferenças climáticas em cada ano. Shimizu *et al.* (2005), através de estudos realizados em ratos, referem que o stress térmico diminui a expressão dos receptores de gonadotrofina nas células da granulosa de folículos em crescimento, resultando numa diminuição da actividade estrogénica por parte destes folículos e num aumento da sensibilidade das células da granulosa à apoptose. Assim sendo, alterações semelhantes podem explicar a diminuição no nº de ovulações e de CL durante os períodos de calor excessivo. Jordan (2003) refere a influência do stress térmico na duração e intensidade do estro e no desenvolvimento folicular, reduzindo a eficiência reprodutiva em bovinos leiteiros. Já Stout (2009), refere que embora até agora não existam provas definitivas que comprovem o efeito do clima no sucesso reprodutivo nos equinos, em 2006 os resultados em vários centros de TE na Europa foram extremamente baixos, relacionando-se os mesmos à ocorrência de um verão muito quente registado nesse mesmo ano.

3.2.2. Idade e categoria da égua dadora

Os resultados obtidos neste estudo vão ao encontro dos obtidos por Warszawsky, Parker, First e Ginther (1972) e Ginther (1982), que referem TO que variam entre 1,1 e 1,4. A TO é frequentemente superior a 1, devido à ocorrência de OM (Stout, 2006). É geralmente aceite que as éguas de raça pura apresentam maior incidência de OM. Outros factores que podem influenciar a incidência de OM são a idade, o estado reprodutivo, a época e a nutrição, existindo relatos que referem valores de incidência de OM que variam entre os 0,83% e os 42,8% (Morel, Newcombe & Swindlehurst, 2005).

Morel e O'Sullivan (2001) referem uma associação entre a idade da égua e a ocorrência de OM, aumentando deste modo a TO em éguas idosas.

As éguas puras de pólo Argentino apresentam em média incidência de OM que rondam os 30% (L. Losinno, comunicação pessoal, Março 15, 2010), resultando assim numa TO média mais elevada em comparação com outras raças.

3.2.3. Garanhão

Embora se tenha observado, que estatisticamente, o garanhão foi uma variável com efeito significativo sobre a TO, não foi encontrada qualquer justificação bibliográfica para este efeito. Deste modo, podemos considerar que estamos perante um acaso estatístico.

3.2.4. Nº do ciclo éstrico

A égua é uma espécie poliéstrica sazonal, embora seja frequente encontrar éguas poliéstricas contínuas. A actividade cíclica nas éguas é extremamente dependente do nº de horas de luz por dia, ou seja do fotoperíodo (Newcombe, 2000). A primeira ovulação da época reprodutiva ocorre dentro de um período de tempo mais limitado do que o observado para a última ovulação e que, dependendo do manejo, latitude e raça, varia em cerca de um mês, desde fim de Abril a fim de Maio, no hemisfério norte, podendo ocasionalmente ter início em Março ou apenas em Junho (Ginther, 1992). Deste modo, a primeira ovulação do ano é a mais difícil de prever, uma vez que as éguas podem vir a desenvolver folículos anovulatórios maiores de 30 mm ou mesmo de 40 mm, que podem ou não ser responsivos à hCG ou à deslorelina (Newcombe, 2000). Este estudo reflecte estes aspectos, uma vez que a TO foi menor nos primeiros ciclos, provavelmente porque nem todas as éguas se encontravam ainda a ciclar. Evidência desta suposição é a de que dos 76 FHA registados ao longo das 3 épocas reprodutivas em análise, 44 (58%) ocorreram durante os 4 primeiros ciclos da época reprodutiva.

As éguas poliéstricas sazonais interrompem a actividade cíclica durante o inverno, mas a última ovulação de uma época reprodutiva pode ocorrer entre Agosto e Janeiro ou até mesmo Fevereiro, no hemisfério norte (Ginther, 1974). As éguas parecem não ter um período de transição bem definido antes de entrarem em anestro, uma vez que apenas um terço apresenta crescimento de folículos anovulatórios maiores de 30 mm enquanto outro terço não apresenta crescimento folicular superior a 20 mm (Newcombe, 2000). A entrada para anestro é influenciada pela diminuição do nº de horas de luz por dia, mas também pelo registo de níveis elevados de stress, tais como a lactação, a nutrição e a perda de condição corporal (Newcombe, 2007). Neste estudo registou-se a diminuição da TO, a partir do 8º ciclo éstrico.

3.2.5. Diâmetro do folículo dominante

O diâmetro máximo dos folículos ovulatórios varia em média entre 40 e 45 mm, mas pode atingir valores superiores (entre 30 e 70 mm). Esta variável pode ser influenciada pela altura do ano (5 a 8 mm maior durante a primavera), raça e OM (4 a 9 mm menores em ovulações duplas) (Cuervo-Arango & Newcombe, 2008). Um estudo realizado por Ginther (1992) mostrou a não ovulação de nenhum folículo com menos de 35 mm. No presente estudo foram registadas 2785 ovulações, tendo 97% dos folículos ovulado dentro do intervalo entre 35 – 45 mm. Apenas 4 folículos ovularam com menos de 35 mm, 3 dos quais no 1º e 2º ciclos da época reprodutiva, e 78 folículos ovularam com mais de 45 mm, 62 (79%) dos quais no 1º e 2º ciclos da época, resultando 8 deles em FHA (10%).

3.2.6. Tratamento indutor de ovulação

A indução da ovulação é uma prática de rotina em programas de TE, sendo o fármaco mais utilizado mundialmente a hCG. No entanto, a eficácia deste fármaco parece diminuir quando utilizado em éguas idosas e várias vezes ao longo da época reprodutiva (Barbaccini, Zavaglia, Gulden, Marchi & Necchi, 2000). A deslorelina é um análogo da GnRH e pode ser utilizado para induzir a ovulação em sucessivos ciclos estrais em éguas jovens e idosas sem diminuir a sua eficácia (Berezowki, Stitch, Wendt & Vest, 2004).

Estudos realizados por McCue, Magee e Gee (2007) referem que não houve diferenças no intervalo entre a administração do indutor de ovulação e a ovulação para estes dois fármacos e referem ainda que a percentagem de ovulações às 48 horas após tratamento foi semelhante.

Este estudo demonstra uma maior TO induzida pela deslorelina em relação à hCG (1,5 *versus* 1,41, respectivamente). As hipóteses que poderão explicar este resultado incluem: maior nº de administrações de deslorelina (n = 656) em comparação com hCG (n = 215), incluindo mais éguas com OM (46% em éguas tratadas com deslorelina *versus* 37% em éguas tratadas com hCG) o que aumenta a TO, e que a falta de resposta à administração repetida de hCG, tal como referido por Barbacini *et al.* (2000), tenha reduzido a TO.

Um estudo realizado por Farquhar, McCue, Vanderwall e Squires (2000) refere que a deslorelina é mais eficaz na indução da ovulação em éguas entre os 10 e os 14 anos de idade e entre os meses de Julho e Outubro. Neste estudo, das 656 administrações de deslorelina, 219 (33,4%) foram em éguas entre os 10 e os 14 anos e 152 (23,2%) foram realizadas nos meses de Julho a Outubro, pondo-se a hipótese de também poder haver alguma influência deste factor nos resultados obtidos para a TO quando induzida com deslorelina.

3.3. Variáveis com influência na taxa de embriões recolhidos

3.3.1. Categoria da égua dadora

Este efeito pode ser devido a dois problemas: falha na fertilização dos oócitos ou mortalidade embrionária precoce (MEP).

Ball *et al.* (1986) e Brinsko *et al.* (1994) referem que a taxa de fertilização não difere significativamente entre éguas jovens e idosas (> 90% e entre 80 e 90%, respectivamente). Já no que respeita à MEP, Ball (2000) refere que a TME precoce entre a fertilização e o 10º dia de gestação varia entre 9% em éguas jovens e 60 a 70% em éguas idosas. As causas para que tal suceda incluem: aumento da susceptibilidade à endometrite, patologia oviductal e alterações morfológicas dos oócitos/embriões.

3.3.2. Garanhão

Losinno e Alvarenga (2007) referem que o garanhão é um dos principais factores intervenientes na TRE, uma vez que nenhum programa se pode sustentar comercialmente se não houver um completo e objectivo exame andrológico e uma estimativa da capacidade reprodutiva dos reprodutores. Deste modo, a qualidade do sémen do garanhão é aqui relevante. Embora todos os garanhões utilizados neste programa apresentassem fertilidade comprovada, ocorre grande variação individual na qualidade dos ejaculados. Esta é afectada por um grande nº de factores entre eles, o nº colheitas ao longo da época reprodutiva, condições ambientais, a manipulação do sémen, entre outras que poderão ter impacto na fertilidade ao longo de uma época reprodutiva.

3.3.3. Nº do ciclo éstrico

A média de embriões recolhidos registados ao longo de uma época reprodutiva, segue a mesma tendência verificada para o nº de ovulações ao longo da época, aumentando do 1º ao 5º ciclo e depois deste diminuindo progressivamente até ao 13º ciclo, onde atinge o mínimo. É normal que tal seja verificado, uma vez que quando a TO é menor, haverá menos oócitos com possibilidade de serem fertilizados e portanto menor nº de embriões recolhidos numa lavagem.

3.3.4. Nº de inseminações artificiais / ciclo

A IA nas éguas é seguida por uma reacção inflamatória uterina, uma vez que a fracção espermática do sémen induz leucocitose no útero da égua devido à activação do complemento (Katila, 2001). A componente seminal do sémen parece ter uma importante função no controlo da endometrite pós-serviço, uma vez que modula a inflamação uterina, devido à supressão da activação do complemento, da libertação de polimorfonucleares e da fagocitose (Troedsson, Loset, Alghamdi, Dahms & Crabo 2001). Quanto mais IA se

realizarem no mesmo ciclo, maior será a reacção inflamatória uterina e consequentemente a magnitude da endometrite. Os efeitos negativos da endometrite no nº de embriões recolhidos serão referidos na alínea f).

3.3.5. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia

Quanto mais ovulações ocorrerem num mesmo ciclo mais embriões se poderão obter por lavagem, uma vez que mais oócitos poderão ser libertados e fertilizados. Dentro das OM foram recolhidos mais embriões provenientes de ovulações bilaterais e síncronas, isto é, provenientes de ovários diferentes e que decorreram com menos de 24 horas de intervalo entre si.

Riera, Roldán e Hinrichs (2005) referem que o nº de embriões recolhidos pode ser menor quando as OM provêm do mesmo ovário, uma vez que num estudo realizado por estes, o nº de lavagens em que se obtiveram 2 embriões foi menor em éguas que apresentaram ovulações unilaterais (37%), em relação às que apresentaram ovulações bilaterais (50%). O mesmo pode ser devido às particularidades anatómicas do ovário da égua, uma vez que a ovulação apenas pode ocorrer na fossa de ovulação, pensando-se que essa é uma barreira para o desenvolvimento simultâneo e ovulação de múltiplos folículos no mesmo ovário (Allen, 2005).

As ovulações assíncronas, em que os folículos ovulam com intervalo superior a 24 horas entre si, resultaram em menos embriões recolhidos. O mesmo pode acontecer por dois motivos: falha na fertilização do oócito proveniente da 2ª ovulação ou falha na recuperação do embrião proveniente da 2ª ovulação, uma vez que tendo as lavagens sido realizadas entre os dias 7,5 e 8,5 após a 1ª ovulação e os embriões apenas migrarem para o útero entre 5 a 6 dias após a ovulação ocorrer, o embrião proveniente da 2ª ovulação ainda se pode encontrar no oviducto e portanto não ser recolhido durante a lavagem.

3.3.6. Endometrite pós inseminação artificial

Watson (2000) refere que a endometrite induzida pelo serviço pode prejudicar o nº de embriões recolhidos devido às seguintes situações: efeito negativo sobre a motilidade dos SPZ e sua viabilidade (impacto sobre a taxa de fertilização) e efeito negativo sobre a viabilidade embrionária precoce caso persista para além dos 5 dias PO, altura em que o embrião chega ao lúmen uterino e o CL se torna sensível à PGF2α (aumento da MEP).

Zent, Troedsson e Xve (1998) e Newcombe (1997) referem taxas de incidência de endometrite, um a dois dias pós-serviço natural, de 15 e 43%, respectivamente.

Neste estudo foi utilizada a IA como método de serviço dirigido. A taxa de endometrite pós – IA foi de 12% (248/2051).

3.4. Variáveis com influência na eficiência da recolha

3.4.1. Categoria da égua dadora

Os motivos referidos para a influência da categoria da égua no nº de embriões recolhidos encaixam-se igualmente na análise desta variável. Desta forma e apenas sumarizando: a égua idosa apresenta maior susceptibilidade à endometrite, comprometendo a motilidade e viabilidade dos SPZ, o que poderá resultar em menores taxas de fertilização e comprometendo a viabilidade embrionária precoce, resultando em maiores taxas de MEP. Para além disso, a égua idosa parece apresentar maior incidência de patologia oviductal e de alterações morfológicas dos oócitos e consequentemente dos embriões, podendo resultar em menores TRE.

Uliani *et al.* (2010) referem TRE de 62% para éguas jovens e 51% para éguas idosas. A ER tende a ser mais baixa do que a TRE uma vez que tem em conta o nº de ovulações e não o nº de lavagens realizadas, no entanto os resultados referidos encontram-se relacionados com os aqui obtidos em que éguas idosas apresentaram ER de 41% e éguas jovens de 63%.

3.4.2. Garanhão

Para além dos factores enumerados para a influência do garanhão no nº de embriões recolhidos, talvez aqui mereça uma maior atenção um outro factor: o volume inseminante. Jasko, Martin e Squires (1992) referem uma associação entre o volume inseminante e a TRE, sugerindo que volumes inseminantes maiores resultam em menores TRE, logo em menor ER, quando comparadas com as ER resultantes de IA com menores volumes inseminantes e com a mesma concentração de SPZ com MPR. No presente estudo a dose e o volume inseminante variaram mas não foram registados, não podendo portanto estes factores ser relacionados com ER.

3.4.3. Nº ciclo éstrico

A ER aumentou do 1º ao 5º ciclo começando depois a diminuir. Também o nº de éguas activas no programa de TE vai diminuindo ao longo dos ciclos e no 9º ciclo apenas 50 éguas se encontram ainda no programa. Estas éguas são na sua maioria éguas idosas ou éguas que ao longo do programa apresentaram uma ER muito baixa, tentando-se prolongar o programa de modo a obter o maior nº de embriões possível. É então de esperar que a ER diminua a partir do 5º ciclo (229 éguas activas de 368 no início do programa), uma vez que éguas idosas apresentam, como já referido anteriormente, ER mais baixas em relação às éguas jovens.

O aumento da ER do 1º ao 5º ciclo pode dever-se à maior incidência de FHA nos 1ºs ciclos da época reprodutiva (57% de FHA nos 4 primeiros ciclos).

A nutrição e o clima também poderão ter alguma influência na ER. Ao longo da época reprodutiva, e com a aproximação do verão, diminui a qualidade da pastagem e aumentam as temperaturas e a humidade relativa, podendo levar a stress térmico e nutricional. Stout (2009) refere que a TRE foi maior durante a primeira parte da temporada, altura em que há mais disponibilidade de alimento e temperaturas mais baixas. O mesmo autor refere que o stress térmico parece influenciar a etapa final do desenvolvimento folicular, a taxa de fertilização e o desenvolvimento do embrião durante os primeiros 7 dias.

3.4.4. Tratamento indutor de ovulação

A ER foi mais elevada em éguas tratadas com hCG (59%), seguida por éguas não tratadas (57%) e por fim por éguas tratadas com deslorelina (50%). Alonso, Douglas e Losinno (2009) referem ER, em OM, de 48% em éguas tratadas com deslorelina, 47% em éguas tratadas com hCG e 48% em éguas não tratadas. Os mesmos autores referem ainda que a ER foi maior em éguas com OM bilaterais tratadas com deslorelina (55%), em relação a éguas tratadas com hCG (41%).

Neste estudo a ER, em OM, foi de 58% em éguas tratadas com deslorelina, 56% em éguas tratadas com hCG e 53% em éguas não tratadas, dados estes que vão ao encontro dos obtidos pelos autores citados no parágrafo anterior. A ER, em ovulações simples, foi de 51% em éguas tratadas com deslorelina, 64% em éguas tratadas com hCG e 61% em éguas não tratadas.

Estes resultados parecem demonstrar que o tratamento indutor de ovulação com deslorelina influencia positivamente a ER quando ocorrerem OM, ao passo que a hCG influencia positivamente a ER quando ocorrerem ovulações simples. Com estes resultados, e em países em que seja permitida a utilização dos dois fármacos para induzir a ovulação, coloca-se a hipótese de trabalho de que o fármaco a utilizar deverá ser seleccionado consoante se preveja a ocorrência de ovulações simples ou múltiplas, uma vez que a selecção do tratamento poderá ter influência na posterior ER.

3.4.5. Nº de inseminações artificiais / ciclo

Para além das considerações a propósito da TER é importante tentar perceber o aumento da ER quando realizadas 2 IA/ciclo. Squires, Brubaker, McCue e Pickett (1998), referem que éguas inseminadas com uma dose refrigerada de 1×10^9 SPZ, duas vezes em dias consecutivos apresentaram TRE mais elevadas (64%) quando comparadas com éguas apenas inseminadas uma vez, com sémen com as mesmas características. Os mesmos autores referem ainda uma possível associação entre o intervalo entre a IA e a ovulação e a TRE, não apresentando no entanto evidências suficientes que comprovem esta relação. Neste estudo foi apenas utilizado sémen fresco, mas os resultados obtidos parecem estar

de acordo com os referidos por Squires *et al.* (1998), parecendo que o melhor plano será então realizar duas IA por ciclo, em dias consecutivos ou separadas por um intervalo de 48 horas, de modo a aumentar a ER.

3.4.6. Nº de ovulações, sua lateralidade e sincronia

A ocorrência de OM é muito importante na eficiência de um programa de TE. A ER para OM foi de 56% *versus* 59% em ovulações simples. Dentro das OM as bilaterais e síncronas foram as que apresentaram maiores ER. Alonso *et al.* (2009) referem que as ER são mais elevadas em éguas com OM bilaterais (55%), em relação a éguas com OM unilaterais (42%), dados que vão ao encontro do aqui apresentado. Os motivos que levam a estes resultados já foram discutidos anteriormente na influência desta variável na TER.

3.4.7. Endometrite pós inseminação artificial

Os factores que se colocam para a influência da endometrite pós-IA na TER, são os mesmos para a ER, pelo que não serão aqui referidos.

3.4.8. Nº de embriões recolhidos

Este efeito é meramente aritmético. Quantos mais embriões se recolherem maior será a ER, uma vez que esta é definida como o quociente entre o nº de embriões recolhidos e o nº de ovulações detectadas.

3.5. **Variáveis com influência na taxa de gestação**

3.5.1. Época reprodutiva

A influência desta variável na taxa de gestação poderá relacionar-se com as diferenças climáticas ao longo das 3 épocas reprodutivas e com a qualidade do alimento disponível. A nutrição é um factor importante na eficiência reprodutiva das éguas. Num estudo realizado por Henneke, Potter e Kreider (1984), éguas com baixa condição corporal originaram menores TG aos 30 dias, quando comparadas com éguas com boa condição corporal.

As alterações climáticas poderão também influenciar a TG. A Argentina é um país com clima sub-tropical, com elevada humidade relativa e temperaturas elevadas durante a época reprodutiva, podendo resultar em stress térmico. Hansen (2007) refere a influência negativa do stress térmico na fertilidade dos bovinos, sendo o factor mais frequentemente observado nas fêmeas a redução na TG. Putney, Drost e Thatcher (1989) referem que o stress térmico nos bovinos aumenta a incidência de embriões atrasados no desenvolvimento (≤ 16 células) e de qualidade inferior, diminuindo a viabilidade dos mesmos. Rensis e Scaramuzzi (2003) referem que o stress térmico pode influenciar a capacidade de produção e secreção de

prostaglandina pelo endométrio, que poderá resultar em luteólise prematura e perda embrionária.

Stout (2009), num estudo realizado num centro de embriões da Argentina, refere que o clima do verão de 2007 não foi tão extremo como os anteriores, não se tendo reflectido tanto os efeitos do stress térmico. O mesmo autor refere a influência do stress térmico na TRE e na qualidade dos embriões. Embora este autor refira que a TG aos 14 dias não pareça ter sido influenciada pelo stress térmico, este estudo revela uma influência da época reprodutiva na TG. Obviamente deveremos ter em conta o manejo das receptoras nesta variável e de outros tipos de stress, tais como stress nutricional e social e que poderão influenciar a TG. De qualquer forma, a TG da época reprodutiva 2007 – 2008 foi a maior das 3 épocas em análise, o que vai ao encontro do descrito pelo autor acima mencionado e que poderá dever-se à presença de um verão menos rigoroso. Deste modo creio que a TG poderá ter sido influenciada pelo stress térmico uma vez que obtendo embriões de pior qualidade estes terão menor viabilidade, resultando em TME mais elevadas.

3.5.2. Categoria da égua dadora

Blanchard *et al.* (2003) referem que a idade da égua se encontra relacionada com menores TG e consequentemente com um aumento da TME. Na égua dadora idosa o mesmo sucede devido a um aumento na susceptibilidade à infecção, deficiente funcionamento dos ovários, do oviducto e do útero (redução do tónus e contracção), diminuição da viabilidade dos oócitos e aumento de defeitos morfológicos dos embriões.

Os embriões destas éguas são menos viáveis devido a dois grandes motivos: ambiente uterino desfavorável, devido à presença de endometrite e/ou produção de oócitos morfológicamente anormais.

Num estudo realizado por Carnevale, *et al.* (2005), embriões de éguas idosas (> 20 anos) apresentaram oócitos de pior qualidade em relação aos de éguas com menos de 20 anos (grau médio de qualidade de 2,2 e 2,4, respectivamente). O mesmo estudo refere que oócitos de éguas com menos de 15 anos resultaram em 50% de gestações, ao passo que oócitos provenientes de éguas com mais de 23 anos, resultaram apenas em 16% de gestações aos 50 dias. Hinrichs (1993) refere que a TRE, a TG e a manutenção da gestação na receptora é menor para embriões provenientes de éguas subférteis. Carney, Squires, Cook, Seidel e Jasko (1991) referem que embriões de qualidade inferior resultam em TG mais baixas.

Outro factor que parece influenciar a TG é o tamanho da vesícula embrionária. Balbuena, Garzarón e Cuervo-Arango (2009) referem que a TG é maior quando são transferidos embriões de 8 dias, com tamanho entre 600 e 899 μm , em relação a embriões mais pequenos. Morel *et al.* (2005) referem que as vesículas embrionárias de éguas idosas têm

tendência para ser mais pequenas, embora os resultados do estudo não sejam estatisticamente significativos.

Uliani *et al.* (2010) referem TG aos 15 dias semelhantes entre embriões provenientes de éguas dadoras jovens (78%) e idosas (75%), referindo no entanto, que a TME (entre os 15 e os 60 dias) foi menor em embriões provenientes de éguas jovens (8%) do que de éguas idosas (23%).

3.5.3. Endometrite pós inseminação artificial

A contractilidade uterina e o tónus uterino parecem estar diminuídos em éguas idosas. A biópsia endometrial destas éguas revela mais células inflamatórias, mais fibrose e menor densidade de glândulas endometriais. Também a acumulação de fluido intra-uterino, avaliada ecograficamente, parece mais extensa nestas éguas (Carnevale & Ginther, 1992).

Vanroose, Kruif e Van Soom (2000) referem que a endometrite induzida pelo serviço tem um efeito directo no ambiente embrionário e, em grande parte dos casos, é acompanhada pela produção de substâncias luteolíticas, como prostaglandinas. A inflamação persistente do útero resulta em luteólise prematura e ME em resposta ao aumento da concentração de prostaglandina. A inflamação pode ainda interferir com a sobrevivência dos embriões.

Num estudo realizado por Carnevale e Ginther (1992) a TG aos 12 dias foi menor e a TME foi maior em éguas idosas (32% *versus* 100% na TG e 62% *versus* 11% na TME). Newcombe (1997) refere que a TG foi menor em éguas com endometrite (49% *versus* 62% em éguas sem endometrite).

3.6. **Variáveis com influência na taxa de mortalidade embrionária**

3.6.1. Época reprodutiva

Os factores que associam a época reprodutiva à TME já foram referidos para a TG pelo que não serão aqui referidos. De qualquer modo, é importante referir que a época reprodutiva parece ter apenas influência na TME durante os primeiros 15 dias de gestação, não parecendo depois dessa altura influenciar a mesma. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Stout (2009), que refere que o stress térmico influencia a eficiência reprodutiva durante os primeiros estádios do processo reprodutivo, os quais incluem o desenvolvimento folicular, o desenvolvimento dos oócitos e o início do desenvolvimento embrionário.

3.6.2. Categoria da égua dadora

Os factores que associam a categoria da égua à TME já foram referidos para a TG. Parece no entanto importante referir que a categoria da égua dadora parece ser mais influente na

TME precoce, isto é, até aos 30 dias de gestação, não tendo este parâmetro influenciado o desenvolvimento embrionário após os 30 dias de gestação.

3.6.3. Endometrite pós inseminação artificial

Os factores que associam a presença de endometrite pós-IA à TME já foram referidos para a TG. De qualquer modo parece-me importante referir que o período entre os 15 e os 30 dias de gestação parece ser o mais influenciado por esta variável. A fixação do embrião bem como o reconhecimento materno da gestação ocorrem por volta do dia 16 de gestação. Geisert, Short e Zavy (1992) referem que o reconhecimento materno da gestação se encontra relacionado com a migração do embrião nos primeiros 15 dias de gestação e que este mecanismo inibe a luteólise através da secreção de um inibidor da síntese de prostaglandina, o qual ainda não foi descoberto. Assim sendo, coloco a hipótese de que os embriões provenientes de éguas com endometrite possam ser mais débeis em relação a embriões provenientes de éguas sem endometrite e como tal existam falhas no reconhecimento materno da gestação, resultando em mortalidade embrionária.

3.7. **Outras variáveis com efeito significativo na eficiência de programas de transferência de embriões**

3.7.1. Incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios

A incidência de FHA é maior em éguas idosas do que em éguas jovens. Estes resultados vão de acordo aos obtidos por Ginther *et al.* (2007), em que 36% dos FHA ocorreram em éguas com mais de 20 anos. O mesmo estudo indica que a ocorrência deste tipo de folículos é mais elevada no início e no final da temporada reprodutiva (5% e 20%, respectivamente) e que a mesma égua tem tendência a formar este tipo de folículos consecutivamente (44%), na mesma época reprodutiva. Este estudo indica ainda uma relação entre a ocorrência deste tipo de folículos e uma concentração elevada de estradiol 3 dias pré-ovulação. Até ao momento é desconhecido o papel da concentração elevada de estradiol na formação de FHA. No entanto, pensa-se que pode existir uma correlação entre concentrações elevadas de estradiol e uma maior vascularização do futuro FHA, mas o mesmo ainda não foi comprovado cientificamente.

.

3.7.2. Incidência de endometrite pós inseminação artificial

A endometrite tem sido reconhecida como uma das principais causas de infertilidade na égua. Algumas das fontes de contaminação uterina que podem levar ao desenvolvimento de endometrite incluem o parto, o exame clínico reprodutivo, a IA ou o serviço natural e a auto-contaminação devida a características conformacionais (Blanchard *et al.*, 2003). Neste aspecto a idade da égua é um factor extremamente importante a ter em conta uma vez que

as éguas idosas se encontram há mais tempo expostas aos factores de risco. No geral, a perda de resistência à infecção encontra-se associada ao avançar da idade e ao nº de partos, factores também frequentemente associados ao aumento do valor da éguas.

3.7.3. Incidência de ovulações múltiplas

A incidência de OM foi mais elevada em éguas idosas do que em éguas jovens. Este estudo corrobora trabalhos anteriores (Morel *et al.*, 2005; Henry, Coryn & Vandeplasseche, 1982), demonstrando um efeito significativo ($p < 0,05$) entre o aumento da idade e da incidência de OM. Morel *et al.* (2005) referem taxas de OM de 20,7% em éguas entre os 2 e os 4 anos de idade e de 35,6% em éguas entre os 17 e os 19 anos de idade.

Os mecanismos que regem a OM em éguas permanecem pouco claros. Merton *et al.* (2003) sugerem que nos equinos tal como nos bovinos ocorra inibição do crescimento dos folículos subordinados na presença de um folículo dominante, uma vez que quando se remove o folículo dominante existe crescimento folicular nos folículos anteriormente subordinados e ovulação dos mesmos, aumentando as OM. Wiltbank, Ginther, Frick, Sartori e Sangsritavong (2000), Ginther, Beg, Bergfelt, Donadeu e Kot (2001) e Ginther, Meira, Beg e Bergfelt (2002) referem que a selecção folicular em espécies monovulatórias, principalmente na vaca, ocorre devido a um declínio nos níveis de FSH, induzido pela secreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante. O folículo dominante é menos dependente de FSH para o desenvolvimento pré-ovulatório, ao passo que os folículos subordinados são bastante FSH dependentes, tornando-se atresícos na sua ausência. Além disso, a capacidade de reacção do folículo dominante à LH, devido ao desenvolvimento de receptores para a LH, reduz ainda mais a sua dependência à FSH, continuando a estimulação de estradiol, inibina e IGF1. Esta capacidade foi também descrita na égua por Ginther, Woods, Meira, Beg e Bergfelt (2003), bem como a associação entre o folículo dominante e o aumento de inibina e estradiol e a diminuição de FSH (Donadeu & Ginther, 2003). Além disso, as concentrações de IGF1 e IGFBP seguem as tendências observadas para outras espécies monovulatórias, tais como os bovinos e os ovinos, sendo a concentração de IGF1 maior nos folículos dominantes e a concentração de IGFBP - 2, - 4 e - 5 mais elevada nos folículos subordinados e atresícos. Deste modo, o mecanismo que rege a emergência do folículo dominante pode ser semelhante ao de outras espécies monovulatórias, indicando que provavelmente a OM na égua é causada pela interrupção no mecanismo de selecção do folículo, permitindo que vários folículos atinjam a maturidade e ovulem.

4. CONCLUSÕES

A eficiência do programa de TE em estudo foi avaliada pela análise da TO, TER, ER, TG e TME. Todas as variáveis que influenciaram significativamente cada um dos parâmetros reprodutivos acima descritos contribuem para a eficiência do programa. Deste modo, e em jeito de conclusão, as variáveis com mais importância na eficiência do programa foram: época reprodutiva, égua dadora, categoria da égua dadora, garanhão, nº ciclo éstrico e presença de endometrite pós-IA.

A égua dadora idosa influenciou todos os parâmetros reprodutivos em análise, representando uma variável extremamente importante na eficiência de um programa de TE.

As éguas dadoras idosas apresentaram taxas de OM mais elevadas, que é uma vantagem em programas de TE, uma vez que poderão ser recolhidos mais do que um embrião numa lavagem. No entanto, este tipo de éguas apresentou maior incidência de FHA, maior incidência de endometrite pós-IA, menos embriões recolhidos, menor ER, menor TG e maior TME nas receptoras, o que contribui para uma menor eficiência do programa de TE.

A conjugação entre a selecção da indústria equina (que não premeia a fertilidade como factor primordial) e o início da vida reprodutiva no fim da carreira desportiva são dois dos factores responsáveis pelo elevado nº de éguas dadoras idosas em programas de TE e pela baixa eficiência dos mesmos. Deste modo, a avaliação minuciosa e crítica e a comunicação com o cliente são fundamentais para perceber o que se pode esperar deste tipo de éguas. É responsabilidade do MV maximizar a saúde reprodutiva e a eficiência de todas as éguas ao seu cuidado, para que as falhas de concepção e gestação sejam minimizadas. Tal implica implementar métodos auxiliares de diagnóstico e estratégias terapêuticas para as éguas com problemas reprodutivos, em particular a endometrite pós-IA.

V. BIBLIOGRAFIA

- Allen, W. (1982). Embryo transfer in the horse. In C. Adams (Ed.), *Mammalian Egg Transfer*. (pp. 126 – 154). Boca Raton: CRC Press.
- Allen, W. (2005). The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in domestic animals*, 40 (4), 310 – 329.
- Alonso, C., Douglas, R. & Losinno, L. (2009). Tasas de ovulación y recuperación en yeguas tratadas com hCG y Deslorelina. In Losinno, L. (Ed.) *Proceedings del I Congreso Argentino de Reproducción Equina*, Tattersall Hipódromo San Isidro, Buenos Aires, Argentina, 18 – 21 de Março 2009, pp 57 – 59, [versão policopiada].
- Balbuena G, Garzarón A, Cuervo-Arango J. (2009). Morfometría embrionaria, desarrollo y tasas de preñez en programas de transferência embrionária. In Losinno, L. (Ed.), *Proceedings del I Congreso Argentino de Reproducción Equina*, Tattersall Hipódromo San Isidro, Buenos Aires, Argentina, 18 – 21 de Março 2009, pp. 103 – 106, [versão policopiada].
- Ball, B., Little, T., Hillman, R. & Woods, G. (1986). Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology*, 26 (5), 611 – 619.
- Ball, B., Little, T., Weber J., & Woods, G. (1989). Survival of day – 4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85, 187 – 194.
- Ball, B. (2000). Reduced reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. Acedido em Mar. 7, 2010. Disponível em: <http://www.avis.org>.
- Barbacini, S., Zavaglia, G., Gulden, P., Marchi, V. & Necchi, D. (2000). Retrospective study on the efficacy of hCG in a equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinary Education*, 2, 404 – 410.
- Bennett, S. (2007). Diagnosis of oviductal disorders and diagnostic techniques. In J. Samper, J. Pycock & A. McKinnon, *Current therapy in equine reproduction*. (2ª edição). (pp. 78 – 82). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Berezowski, C., Stitch, K., Wendt, K. & Vest, T. (2004). Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 24 (6), 231 – 233.
- Betteridge, K. & Mitchell, D. (1974). Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *Journal of reproduction and fertility*, 39, 145 – 148.
- Blanchard, T., Varner, D., Schumacher, J., Love, C., Brinsko, S. & Rigby, S. (2003). *Manual of equine reproduction*. (2ª edição). St Louis, Missouri: Mosby.
- Brinsko, S., Ball, B., Miller, P., Thomas P., & Ellington, J. (1994). In vitro development of day 2 embryos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 371 – 378.
- Brinsko, S., Ball, B., Ignatz, G., Thomas, P., Currie, W. & Ellington, J. (1995). Initiation of transcription and nucleogenesis in equine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 42, 298 – 302.

- Bruyas, J., Trocherie, E., Hecht, S., Lepoutre, N., Granchamp des Raux, A., Nicaise, J., Vérin, X., Bertrand, J., Barrier-Battut, I., Fiéni, F., Hoier, R., Renault, A., Egron, L. & Tainturier, D. (2000). Use of busereline to induce ovulation in donor mares. In T. Katila, J. Wade (Eds.), *Proceedings of the 5th Internatinal Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3*, Saari, Finland, 6 – 9 Julho, pp 76 – 78.
- Cadario, M. (2006). La yegua geriatric. In Organización Colegial Veterinaria y Asociación Andaluza de Veterinarios Especialistas en Équidos, *Proceedings del VII Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina*, Sevilha, 24 – 26 Novembro, pp 43 – 50.
- Carnevale, E. & Ginther, O. (1992). Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, 37 (5), 1101-1115.
- Carnevale, E., Griffin, P. & Ginther, O. (1993). Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus of mares. *Equine Veterinary Journal*, Suplemento 15, 31 – 35.
- Carnevale, E. & Ginther, O. (1995). Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of reproduction*, 1, 209 – 214.
- Carnevale, E., Coutinho da Silva, M., Panzani, D., Stokes, J. & Squires, E. (2005). Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, 64, 519 – 527.
- Carney, N., Squires, E., Cook, V., Seidel, G. & Jasko, D. (1991). Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*, 36 (1), 23 – 32.
- Coutinho da Silva, M. (2008). When should a mare go for assisted reproduction. *Theriogenology*, 70, 441 – 444.
- Cuervo-Arango, J. & Newcombe, J. (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*, 69 (6), 681-687.
- Donadeu, F. & Ginther, O. (2003). Supression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. *Theriogenology*, 60, 1423 – 1434.
- Douglas, R. (2009). Endocrine assessment of the problem mare: non pregnant and pregnant. In Losinno, L. (Ed.), *Proceedings del I Congreso Argentino de Reproducción Equina*, Tattersall Hipódromo San Isidro, Buenos Aires, Argentina, 18 – 21 de Março 2009, pp. 21 – 23, [versão policopiada].
- Farquhar, V., McCue, P., Vanderwall, D. & Squires, L. (2000). Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. *Journal of Equine Veterinary Science*, 20 (11), 722 – 725.
- Ferreira-Dias, G., Nequim, L. & King, S. (1999). Morphologic comparisons among equine endometrium categories I, II and III, using light and transmission electron microscopy. *American Journal of Veterinary Research*, 60 (1), 49 – 55.
- Geisert, R., Short, E. & Zavy, M. (1992). Maternal recognition of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 28 (1 – 4), 287 – 298.

- Ginther, O. (1974). Occurrence of anoestrus, oestrus, dioestrus and ovulation over a 12 month period in mares. *American Journal of Veterinary Research*, 35, 1173 – 1179.
- Ginther, O. (1982). Twinning in mares: a review of recent studies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2, 127 – 135.
- Ginther, O. (1992). Reproductive biology of the mare. (2ª edição). Cross Plains, Wisconsin: Equiservices.
- Ginther, O., Beg, M., Bergfelt, D., Donadeu, F. & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction*, 65, 638 – 647.
- Ginther, O., Meira, C., Beg, M. & Bergfelt, D. (2002). Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. *Biology of Reproduction*, 67 (3), 862 – 867.
- Ginther, O., Woods, B., Meira, C., Beg, M. & Bergfelt, D. (2003). Hormonal mechanisms of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. *Reproduction*, 126, 653 – 660.
- Ginther, O., Gastal, E., Gastal, M. & Beg, M. (2006). Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Animal Reproduction Science*, 3 (1), 29 – 40.
- Ginther, O., Gastal, E., Gastal, M. & Beg, M. (2007). Incidence, endocrinology, vascularity and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27 (3), 130 – 139.
- Gordon, I. (2008). Transferencia de Embriones y Biotecnologías Asociadas en la Especie Equina. In G. Palma, *Biotecnología de la Reproducción*. (3ª edição). (pp. 589 – 624). Mar de Plata: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Ediciones.
- Hansen, P. (2007). To be or not to be – determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 68 (suplemento 1), S40 – S48.
- Henneke, D., Potter, G. & Kreider, J. (1984). Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, 21 (6), 897 – 909.
- Henry, M., Coryn, M. & Vandeplassche, M. (1982). Multiple ovulation in the mare. *Veterinary Medicine*, 29, 170 – 184.
- Heuer, J., King, S., Gardiner, C., Ferreira-Dias, G. & Nequim L. (1993). Uterine secretions from different endometrial classifications affect the viability of early murine embryos cultured in vitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, 13 (9), 494 – 497.
- Hinrichs, K. (1993). Embryo transfer in the mare: a status report. *Animal Reproduction Science*, 33 (1 – 4), 227 – 240.
- Hinrichs, K. & Choi, Y. (2005). Assisted reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 4, 210 – 218.
- Hunt, C., Aguilar, J., Sporleder, C & Losinno, L. (2005). In 21st Annual Meeting AETE, Keszthely, Hungary, 9 – 10 Setembro, pp. 146 – 147.
- Hurtgen, J. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*, 66, 560 – 566.

- Inoue, Y., Katsumi, I., Tamotsu, T., Nishimura, N., Hatazoe, T. & Sato, K. (2000). Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. In AAEP (Ed.), *Proceedings of the 46th annual convention of the AAEP*, San Antonio, Texas, USA, 26 – 29 Novembro, pp 325 – 329.
- Jasko, D., Martin, J. & Squires, E. (1992). Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology*, 37 (6), 1233 – 1239.
- Jasko, D. (2002). Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. *Theriogenology*, 58 (2 – 4), 713 – 716.
- Jordan, E. (2003). Effects of heat stress on reproduction. *Journal of Dairy Science*, 86, 104 – 114.
- Katila, T. (2001). Sperm-uterine interactions: a review. *Animal Reproduction Science*, 68 (3 – 4), 267 – 272.
- Kenney, R. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 172 (3), 241 – 262.
- LeBlanc, M. (2008). The chronically infertile mare. In AAEP (Ed.), *Proceedings of the 54th Annual Convention of the AAEP*, San Diego, Califórnia, USA, 6 – 10 Dezembro, pp. 391 – 407.
- Losinno, L., Aguilar, J. & Lisa, H. (2001). Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In T. Katila, J. Wade (Eds.), *Proceedings of the 5th Internatinal Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3*, Saari, Finland, 6 – 9 Julho, pp 81 – 83.
- Losinno, L. (2005). Factores criticos en programas de transferencias embrionarias en equinos. Documento fornecido pelo autor em Nov. 10, 2009, (não publicado).
- Losinno, L., Vollenweider, A., Castañeira, C. & Pasqualini, S. (2007). Superovulación en yeguas com gonadotrofina menopausica humana (hMG). Resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae*, Suplemento 35, 1224.
- Losinno, L. & Alvarenga, M. (2007). Critical factors on equine embryo transfer programs. *Acta Scientiae Veterinaria*, 34 (1), 39 – 49.
- Losinno, L. (2009). Transferencia embrionaria en equinos. Acedido em Mai. 20, 2010, disponível em http://www.congresoreproequina.com.ar/2011/docs/transferencia_embcionaria_equinos.pdf.
- McCue, P. & Squires, E. (2002). Persistent anovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*, 58, 541 – 543.
- McCue, P., Niswender, K. & Macon, K. (2003). Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. *Journal of Equine Veterinary Science*, 23 (8), 336 – 337.
- McCue, P., Magee, C. & Gee, E. (2007). Comparison of compounded deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinay Science*, 27 (2), 58 – 61.
- McCue, P. (2008). The problem mare: management philosophy, diagnostic procedures, and therapeutic options. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28 (11), 619 – 626.

- McKinnon, A. & Squires, E., (2007). Embryo transfer and related technologies. In J. Samper, J. Pycock & A. McKinnon, *Current therapy in equine reproduction*. (2ª edição). (pp. 319 – 334). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- McKinnon, A. & Squires, E. (2009). Embryo transfer and related Technologies. In AAEP (Ed.), *Proceedings of the 11th Annual Resort Symposium of the AAEP*, Gold Coast, Australia, 25 – 28 Janeiro, pp. 27 – 57.
- Merton, J., Roos, A., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. & Dieleman, S. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59 (2), 651 – 667.
- Morel, M. & O’Sullivan, J. (2001). Ovulation rate and distribution in thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age. *Animal Reproduction Science*, 2119, 1–12.
- Morel, M., Newcombe, J. & Swindlehurst, J. (2005). The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. *Theriogenology*, 63, 2482-2493.
- Mottershead, J. (2007). Anovulatory hemorrhagic follicles. Acedido em Abr. 10, 2010, disponível em <http://www.equine-reproduction.com/articles/AHF.shtml>.
- Newcombe, J. (1997). The effect of the incidence and depth of intra-uterine fluid in early dioestrus on pregnancy rate in mares. *Pferdeheilkunde*, 13, 545, 1997.
- Newcombe, J. (2000). Seasonal influence on ovarian activity: winter anoestrus and transition to cyclic activity. *Journal of Equine Veterinary Science*, 20, 307 – 309.
- Newcombe, J. (2007). The follicle: practical aspects of follicle control. In J. Samper, J. Pycock & A. McKinnon, *Current therapy in equine reproduction*. (2ª edição). (pp 14 – 21). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Putney, D., Drost, M. & Thatcher, W. (1989). Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, 31 (4), 765 – 778.
- Pycock, J. (2009). Clinical management of old problem mares. In Losinno, L. (Ed.), *Proceedings del I Congreso Argentino de Reproducción Equina*, Tattersall Hipódromo San Isidro, Buenos Aires, Argentina, 18 – 21 de Março 2009, pp. 111 – 116, [versão policopiada].
- Rambags, B., van Bortel, D., Tharasanit, T., Lenstra, J., Colenbrander, B. & Stout, T. (2005). Oocyte mitochondrial degeneration during reproductive ageing in the mare. In H. Alm, H. Torner & J. Wade (Eds.), *Proceedings of a workshop international equine gamete group, Havemeyer Foundation Monograph Series nº 18*, Kühlungsborn, Germany, 18 – 21 Setembro, pp. 25 – 27.
- Regulamento do Livro Genealógico do Cavalo da Raça Lusitana. Acedido em Mai. 10, 2010, em <http://www.cavalo-lusitano.com/apsl/regulamento-do-livro-genealogico/>.
- Remy, B., Bruyas, J., Beckers, J., Leduc, F., Fiéni, F. & Tainturier, D. (1997). Ovulation rates in donor mares treated with purified equine FSH. *Theriogenology*, 47 (1), 394.

- Rensis, F. & Scaramuzzi, R. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. *Theriogenology*, 60 (6), 1139 – 1151.
- Ricketts, S. & Alonso, S. (1991). Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques, *Equine Veterinary Journal*, 23, 189 – 192.
- Ricketts, S. & Troedsson, M. (2007). Fertility expectations and management for optimal fertility. In J. Samper, J. Pycock & A. McKinnon, *Current therapy in equine reproduction*. (2ª edição). (pp. 53 – 69). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Ricketts, S. (2008). Management of the infertile/subfertile mare. In WEVA (Ed.), *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, Moscovo, Russia, 28 Janeiro – 1 Fevereiro, pp 244 – 256.
- Riera, F., Roldán, J. and Hinrichs, K. (2005). Ipsilateral double ovulation is associated with reduced embryo recovery in mares. In M. Alvarenga & J. Wade (Eds.), *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 14*, Newmarket: R&W Publications, pp 108 – 109.
- Samper, J. (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 68, 219 – 228.
- Samper, J. (2008). Breeding the problem mare by artificial insemination. In AAEP (Ed.), *Proceedings of the 54th annual convention of the AAEP*, San Diego, Califórnia, USA, 6 – 10 Dezembro, pp 408 – 413.
- Shimizu, T., Ohshima, I., Ozawa, M., Takahashi, S., Tajima, A., Shiota, M., Miyazaki, H & Kanai, Y. (2005). Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction*, 129, 463 – 472.
- Squires, E., Garcia, R. & Ginther, O. (1985). Factors affecting the success of equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*, Suplemento 3, 920-925.
- Squires, E., McClain, M., Ginther, O. & McKinnon, A. (1987). Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. *Theriogenology*, 28, 609-613.
- Squires, E., McKinnon, A., Carnevale, E., Morris, R. & Nett, T. (1987). Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulating mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suplemento 35, 399 – 403.
- Squires, E. & Seidel, G. (1995). Collection and transfer of equine embryos. Fort Collins, Colorado: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory – Colorado State University.
- Squires, E., Brubaker, J., McCue, P. & Pickett, B. (1998). Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*, 49 (4), 743 – 749.
- Squires E., McCue, P & Vanderwall, D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 91 – 104.
- Squires, E., Carnevale, E., McCue, P. & Bruemmer, J. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 59, 151 – 170.

- Stout, T. (2006). Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal*, 38 (5), 467 – 478.
- Stout, T. (2009). Effect of climate on the success of an equine embryo transfer program. Acedido em Abr. 20, 2010, disponível em <http://scholar.google.pt/>.
- Tainturier, D., Bruyas, J., Dumont, P., Fieni, F. & Escouflaire (1989). La transplantation embryonnaire chez la Jument. *Revue Médecine Vétérinaire*, 140, 1109 – 1115.
- Troedsson, M., Loset, K., Alghamdi, B., Dahms, B. & Crabo, B. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, 68 (3 – 4), 273 – 278.
- Uliani, R., Neto, C., Dell'Aqua, J., Pessoa, M., Camargo, A., Alvarenga, R. & Alvarenga, M. (2010). Effect of mare breed and age on embryo transfer efficiency. Acedido em Mai. 20, 2010, disponível em <http://www.sciencedirect.com>.
- Vanderwall, D. (2000). Current equine embryo transfer techniques. Acedido em Mar. 7, 2010. Disponível em: <http://www.ivos.org>.
- Vanderwall, D. & Newcombe, J. (2007). Early embryonic loss. In J. Samper, J. Pycock & A. McKinnon, *Current therapy in equine reproduction*. (2ª edição). (pp. 374 – 383). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Vanderwall, D. (2008). Early embryonic loss in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28 (11), 691 – 702.
- Vanroose, G., Kruif, A. & Van Soom, A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, 60, 131 – 143.
- Vogelsang, S. & Vogelsang, M. (1989). Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*, Suplemento 8, 71.
- Warszawsky, L., Parker, W., First, N. & Ginther, O. (1972). Gross changes of internal genitalia during the oestrous cycle in the mare. *American Journal of Veterinary Research*, 33 (1), 19-26.
- Watson, E. (2000). Post breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*, 60 – 61, 221 – 232.
- Wiltbank, M., Ginther, O., Fricke, R., Sartori, R. & Sangsritavong, S. (2000). Mechanisms that prevent and produce double ovulations in cattle. *Journal of Dairy Science*, 83 (12), 2998 – 3007.
- Zent, W., Troedsson, M. & Xve, J. (1998). Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. In AAEP (Ed.), *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, Baltimore, Maryland, USA, 6 – 9 Dezembro, pp.64 – 65.